

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 31 日 (31.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/08417 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/10, (74) 代理人: 小林純子, 外(KOBAYASHI, Sumiko et al.);
1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02 〒104-0028 東京都中央区八重洲2丁目8番7号 福岡ビル9階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/06392
- (22) 国際出願日: 2001 年 7 月 25 日 (25.07.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-229064 2000 年 7 月 25 日 (25.07.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤隆司 (ITO, Takashi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ704号 Ibaraki (JP). 田中葉子 (TANAKA, Yoko) [JP/JP]; 〒610-0331 京都府京田辺市田辺勇田80-50 Kyoto (JP). 近藤光代 (KONDO, Mitsuyo) [JP/JP]; 〒666-0104 兵庫県川西市笹部2丁目17番12号 Hyogo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN

(54) 発明の名称: 組換え蛋白質の製造法

(57) Abstract: It is intended to produce a target protein in procaryotic or eucaryotic cells. A DNA encoding the full-length amino acid sequence or a part of the same of a target protein is prepared and the target protein is produced by a gene recombination technique with the use of this DNA.

(57) 要約:

本発明は目的蛋白質の原核または真核細胞における製造を目的とする。

目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAを調製し、このDNAを用いて遺伝子組換え技術により目的蛋白質を製造する。

WO 02/08417 A1

明細書

組換え蛋白質の製造法

5 技術分野

本発明は蛋白質の製造方法に関する。さらに詳しくは、本発明は目的蛋白質を原核または真核細胞で製造する方法、および原核または真核細胞における発現に適した目的蛋白質をコードするDNAの調製方法に関する。

10 背景技術

有用蛋白質を遺伝子組換え技術を用いて原核細胞及び真核細胞で製造する試みがなされている。比較的高分子量の蛋白質の場合、化学合成法によって蛋白質を製造することは非常に困難である。また低分子量の蛋白質の場合、融合蛋白質を遺伝子組換え技術を用いて効率的に製造することができる。原核細胞、特に大腸菌を用いた有用蛋白質の発現は迅速かつ安価に行うことが可能である。しかしながら遺伝子組換え技術を用いて蛋白質の発現を行う場合、蛋白質の種類によっては、ほとんど発現が認められなかったり、発現したとしても非常に発現量が低い場合がある。

目的蛋白質の発現を異種生物で発現させる場合、例えば真核生物の蛋白質を原核細胞で発現させる場合では、コドンの使用 (codon usage) が異なること、真核生物の分泌蛋白質を原核細胞で発現する場合には本来真核生物において翻訳が開始されるシグナルペプチド部分を除いて成熟蛋白質部分のみを発現させる場合が多いことなどから、真核生物では高い発現が見られる蛋白質が原核細胞では発現しなかったり、発現したとしても発現量が極めて低い等の問題が生じている。また、目的蛋白質を同種の宿主を用いて発現させる場合、例えばヒト由来の蛋白質を動物細胞を用いて発現させる場合、においても蛋白質の種類によって発現量が大きく異なる場合がある。その蛋白質を遺伝子組換え技術を用いて原核細胞及び真核細胞において高発現させる技術の開発は産業上きわめて有用である。

発明の開示

本発明者らは、有用蛋白質を遺伝子組換え技術を用いて原核細胞及び真核細胞で製造する際、発現量の差異は主として蛋白質をコードするDNAの配列に起因することを見出し、さらに種々の検討を行い、本発明を完成した。

5 すなわち、本発明は、

- (1) 1) 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードする複数種のDNAの混合物を用いて、各DNAを宿主細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつ該レポーター遺伝子の上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、
- 10 2) 該組換えベクターで宿主細胞を形質転換し、
- 3) 得られた形質転換体を培養し、
- 4) レポーター遺伝子の発現を測定し、
- 5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、
- 15 かつ目的蛋白質をコードするDNAを調製することを特徴とする、発現に適した目的蛋白質をコードするDNAの製造法、
- (2) 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列が目的蛋白質の全長もしくはN末端を含む部分アミノ酸配列である前記(1)記載の製造法、
- (3) 1) 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードする複数のDNA
- 20 Aの混合物を用いて、各DNAを宿主細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつ該レポーター遺伝子の上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、
- 2) 該組換えベクターで宿主細胞を形質転換し、
- 3) 得られた形質転換体を培養し、
- 25 4) レポーター遺伝子の発現を測定し、
- 5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質をコードするDNAを含有する組換えベクターを調製し、
- 6) 該組換えベクターで宿主細胞を形質転換し、

7) 形質転換体を培養することを特徴とする、目的蛋白質またはその塩を製造する方法、

(4) 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列が目的蛋白質の全長もしくはN末端を含む部分アミノ酸配列である前記(2)記載の製造法、

- 5 (5) 1) 真核生物由来の目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードする複数のDNAの混合物を用いて、各DNAを原核細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつレポーター遺伝子の上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、

2) 該組換えベクターで原核細胞を形質転換し、

- 10 3) 得られた原核細胞形質転換体を培養し、

4) レポーター遺伝子の発現を測定し、

5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質をコードするDNAを調製することを特徴とする、原核細胞における発現に

- 15 適した真核生物由来の目的蛋白質をコードするDNAの製造法、

(6) 1) 真核生物由来の目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードする複数のDNAの混合物を用いて、各DNAを原核細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつ該レポーター遺伝子の上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、

- 20 2) 該組換えベクターで原核細胞を形質転換し、

3) 得られた原核細胞形質転換体を培養し、

4) レポーター遺伝子の発現を測定し、

5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質をコードするDNAを含有する組換えベクターを調製し、

- 25

6) 該組換えベクターで原核細胞を形質転換し、

7) 原核細胞形質転換体を培養することを特徴とする、真核生物由来の目的蛋白質またはその塩を原核細胞において製造する方法、

(7) 前記(1)記載の製造法で得られた、レポーター遺伝子の高い発現が確認

された形質転換体が有する目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質の全長をコードするDNA、

- (8) 前記(1)記載の製造法で得られた、レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の部分アミノ酸配列をコードするDNAの3'末端側または(および)5'末端側に、当該目的蛋白質の残余アミノ酸配列をコードするDNAを連結した、目的蛋白質の全長をコードする非天然型DNA、

- (9) 配列番号: 119、配列番号: 120、配列番号: 121または配列番号: 122で表わされる塩基配列を有するDNA、

(10) 前記(7)~(9)のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター、

(11) 前記(10)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、および

- (12) 前記(11)記載の形質転換体を培養し、目的蛋白質を生成せしめることを特徴とする目的蛋白質またはその塩の製造法などに関する。

図面の簡単な説明

- 図1はプラスミドpGFPNPの構築図を示す。
- 図2はプラスミドpGFPNPRGの構築図を示す。
- 図3はプラスミドpTFCRGALの構築図を示す。
- 図4はプラスミドpTFCS4の構築図を示す。
- 図5は大腸菌MM294(DE3)/pTFCRGALおよび大腸菌MM294(DE3)/pTFCS4の増殖曲線を示す。
- 図6は大腸菌MM294(DE3)/pTFCRGALおよび大腸菌MM294(DE3)/pTFCS4の生産物の解析結果を示す。
- 図7はプラスミドpGFPNPMPの構築図を示す。
- 図8はプラスミドpNPHGH1actsの構築図を示す。
- 図9はプラスミドpNPMP1Fの構築図を示す。

図10はプラスミドpNPMP I FNOの構築図を示す。

図11は実施例6で得られた大腸菌クローンの蛍光強度を示す。

図12は天然型塩基配列を有するプラスミドpNPMP I Fを保持する大腸菌 JM109/pNPMP I Fと改変型塩基配列を有するプラスミドpNPMP I FNOを保持する大腸菌 JM109/pNPMP I FNOの増殖曲線とMP I F 1Δ23の発現量を示す。図中、○は生育曲線を、●はMP I F 1Δ23の発現量を示す。

図13はプラスミドpKANPの構築図を示す。

図14はZ A Q-1リガンドのアミノ酸配列、天然型塩基配列を示す。

10 図15はプラスミドpTC I I Z A QNの構築図を示す。

図16はZ A Q-1リガンドのアミノ酸配列、天然型及び使用頻度の高いコドンを用いた塩基配列を示す。

図17は使用頻度の高いコドンを用いたZ A Q-1構造遺伝子の構築に用いた合成DNAを示す。

15 図18はプラスミドpTC I I Z A QSの構築図を示す。

図19はプラスミドpKANP Z A Qの構築図を示す。

図20は実施例14で得られた塩基配列を示す。

図21はプラスミドpTC I I Z A QNOの構築図を示す。

図22は実施例16の発現解析の結果を示す。

20 図23はプラスミドpTCRGDEの構築図を示す。

図24はプラスミドpTCRGNODEの構築図を示す。

図25は実施例19で得られたラットGALP全長至適化塩基配列を示す。

図26はプラスミドpTCRGTODEの構築図を示す。

図27は実施例21で得られたSDS-PAGEの結果を示す。

25 図28はプラスミドpQB I 25-3の構築図を示す。

図29は実施例23で用いたLLPLのN末端部分の塩基配列を示す。

図30は実施例24で行った蛍光測定の結果を示す。

図31は実施例25で行った解析結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

蛋白質を構成する各アミノ酸をコードするコドンは以下のとおりである。

- Phe : TTY (TTTまたはTTC)
Leu : TTRまたはCTN (TTA、TTG、CTT、CTC、CTAまたは
5 CTG)
Ile : ATH (ATT、ATCまたはATA)
Met : ATG
Val : GTN (GTT、GTC、GTAまたはGTG)
Ser : TCNまたはAGY (TCT、TCC、TCA、TCG、AGT、AG
10 C)
Pro : CCN (CCT、CCC、CCAまたはCCG)
Thr : ACN (ACT、ACC、ACAまたはACG)
Ala : GCN (GCT、GCC、GCAまたはGCG)
Tyr : TAY (TATまたはTAC)
15 His : CAY (CATまたはCAC)
Gln : CAR (CAAまたはCAG)
Asn : AAY (AATまたはAAC)
Lys : AAR (AAAまたはAAG)
Asp : GAY (GATまたはGAC)
20 Glu : GAR (GAAまたはGAG)
Cys : TGY (TGTまたはTGC)
Trp : TGG
Arg : CGNまたはAGR (CGT、CGC、CGA、CGG、AGAまたは
AGG)
25 Gly : GGN (GGT、GGC、GGAまたはGGG)
終止コドン : TARまたはTGA (TAA、TAGまたはTGA)

本明細書において目的蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。

目的蛋白質としては、医薬、試薬、原料、飼料などに使用できる蛋白質が用いられる。より具体的には、目的蛋白質としては、生理活性を有する真核生物由来の蛋白質が用いられ、例えば、成長因子類、インターロイキン類、インターフェロン類、ケモカイン類、生理活性ペプチド類（例、KiSS-1ペプチド（WO 00/24890）、RFRP-1（WO00/29441）、アペリン（WO 99/33976）、PrRP（WO97/24436）、GALP（WO99/48920）、GPR8リガンド、ZAQ-1リガンド、アンジオテンシン、ブラジキニン、カルシトニン、コナントキン、コルチコトロピン放出因子、ダイノルフィン、エンドルフィン、エンケファリン、ガラニン、GALP（ラット・ガラニンレセプターに対するリガンドペプチド；WO99/48920）、MP
5 IF-1 Δ 23（Myeloid progenitor inhibitory factor-1 Δ 23；WO95/17092）、ガストリン、グルカゴン、成長ホルモン放出因子、FMRF-アミド、ニューロキニン、ニューロメジン、ニューロペプチド、ノシセプチン、ノシスタチン、オレキシン-B、セクレチン、サブスタンスP、ウロコルチン、VI
10 P、PACAP、ACTH、各種オピオイド類）などが挙げられる。

上記GPR8リガンドとしては、7膜貫通型受容体蛋白質GPR8（O' Dowd, B. F. et al., Genomics, 28巻、84-91頁、1995年）に対するリガンド活性、例えば、GPR8との結合活性、GPR8発現細胞に対する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生
20 成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性等）を有するポリペプチドであれば、いかなるものであってもよいが、好ましくは配列番号：116で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましく用いられる。

25 上記ZAQ-1リガンドとしては、ZAQ受容体に対するリガンドが用いられるが、具体的には、配列番号：117で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

これらの蛋白質はそれら単独で用いられてもよく、またそれらのC末端側に他の真核生物由来の蛋白質、原核生物由来の蛋白質またはポリヒスチジンなどのタ

グを融合して用いてもよい。

C末端側に融合させる真核生物由来の蛋白質としては、例えば、線維芽細胞成長因子（a F G F、b F G Fなど）またはそのムテインまたはこれらの一部（断片）（例えば、b F G F C S 2 3 ムテインなど）などが好ましく用いられる。

- 5 b F G F C S 2 3 ムテインとしては、例えば、配列番号：1 1 8 で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質などが用いられる。

目的蛋白質は塩を形成していてもよく、目的蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、
10 酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- レポーター遺伝子としては、レポーター遺伝子の発現の有無が容易に確認できる遺伝子があげられ、具体的にはグリーンフルオレセント蛋白質（G F P）遺伝子などの蛍光性蛋白質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素などの酵素遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子などの遺伝子が一つもしくは複数（好ましくは、2 から 3 個）で用いられ、なかでもグリーンフルオレセント蛋白質（G F
15 P）遺伝子などが好ましい。

- 一つのアミノ酸をコードする複数のコドンを用いることにより、同一のアミノ酸配列をコードする複数のDNAの混合物が得られる。目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードする複数のDNAは、アミノ酸配列を構成するアミノ酸をコードする混合塩基を用い、通常の方法に従って化学合成することができる。
25 る。

目的蛋白質の全長アミノ酸配列とは、目的蛋白質の完全長のアミノ酸配列を示す。

目的蛋白質の部分アミノ酸配列とは、目的蛋白質の全長アミノ酸配列の任意の部分アミノ酸配列を示し、通常、約 5 個以上、好ましくは約 5 ～ 5 0 個、より好

- ましくは約5～15個、さらに好ましくは約5～10個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列が用いられる。また、この部分アミノ酸配列としては、目的蛋白質の全長アミノ酸配列のN末端の部分アミノ酸配列が好ましく、通常N末端から数えて、約5個以上、好ましくは約5～50個、より好ましくは約5～15個、さらに好ましくは約5～10個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列が好ましく用いられる。特に、目的蛋白質の全長アミノ酸配列のN末端から約15番目のアミノ酸残基に至るアミノ酸配列、好ましくはN末端から約10番目のアミノ酸残基に至るアミノ酸配列が挙げられる。

- DNA断片同士が連結することを防ぐために、DNA断片の5'末端と3'末端には相異なる制限酵素認識部位を設けることが好ましい。

複数のDNAの混合物を用いて、各DNAを宿主細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中のプロモーターDNAの下流かつレポーター遺伝子上流に組み込むことにより、レポーター遺伝子の発現を確認するための複数の組換えベクターの混合物が得られる。

- 得られた組換えベクターの混合物を用いて宿主細胞を形質転換することによって、複数種の形質転換体を得られる。

得られた複数種の形質転換体の混合物を培養し、レポーター遺伝子の発現の有無の確認を行う。

- 原核細胞を宿主とした場合には、寒天培地などの固体培地の上に形質転換体の混合物を塗布し培養することによって、各形質転換体のレポーター遺伝子の発現量を容易に確認することができるとともに、容易に単一クローンを分離することができる。レポーター遺伝子の発現量は、レポーター遺伝子産物の量を測定することによって測定することができる。たとえばレポーター遺伝子としてGFP遺伝子を用いる場合には、350～500nmの波長で励起させ、450～550nmの蛍光強度を測定することによってGFPの量を測定することができる。薬剤耐性遺伝子をレポーター遺伝子として用いる場合には、適当な濃度の薬剤を含有した寒天培地などの固体培地の上に形質転換体の混合物を塗布し培養する事によって、レポーター遺伝子の発現の高い形質転換体のみを生育させることができる。酵素遺伝子をレポーター遺伝子として用いる場合には、形質転換体が産生す

る酵素活性を公知の方法に従って測定できる。

真核細胞を宿主とした場合、たとえばレポーター遺伝子としてGFP遺伝子を用いる場合には、複数種の形質転換体の混合物を培養してフローサイトメトリー装置のセルソーティング機能を利用することにより、複数種の形質転換体からGFP遺伝子の発現が高い細胞株を取得する事が出来る。また限界希釈法により単一細胞を取得し、その細胞を培養した後にレポーター遺伝子の発現量を蛍光強度の測定や形質転換体が産生する酵素の活性を公知の方法に従って測定することができる。

原核細胞の場合には、レポーター遺伝子の発現が確認できた形質転換体（クローン）から、公知の方法に従って組換えベクターを抽出することができる。抽出した組換えベクターを適当な制限酵素で消化することによって、目的蛋白質の原核細胞での製造に適し、目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNA断片が得られる。必要により得られたDNA断片の塩基配列を確認してもよい。また、レポーター遺伝子の発現が確認できた形質転換体（クローン）から、公知の方法に従って目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードするDNAをコロニーPCR法により増幅したのち、適当な制限酵素で消化することによって、目的蛋白質の原核細胞での製造に適し、目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードするDNA断片が得られる。必要により得られたDNA断片の塩基配列を確認してもよい。また、得られたDNA断片の塩基配列と同じ塩基配列を有し、目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAを化学合成してもよい。

真核細胞の場合には、レポーター遺伝子の発現が確認できた形質転換体（クローン）から、公知の方法に従ってmRNAを抽出することができる。抽出したmRNAより逆転写酵素を用いてcDNAを調製することにより、目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNA断片が得られる。必要により得られたDNA断片の塩基配列を確認してもよい。また、形質転換体（クローン）から、公知の方法に従ってDNAを抽出し、PCR法により増幅したのち、適当な制限酵素で消化することによって、目的蛋白質の製造に適し、目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードするDNA断片が得られる。必要により得られたDN

A断片の塩基配列を確認してもよい。また、得られたDNA断片の塩基配列と同じ塩基配列を有し、目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAを化学合成してもよい。

本発明により、このようにして得られた目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAを、以下「得られた目的蛋白質の全長をコードするDNA」などと略記することがある。

目的蛋白質の製造のためには、目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードする天然型DNA（例えば、cDNA、ゲノムDNA）配列を保持するクローンに比べ、レポーター遺伝子のより高い発現が見られたクローンから得られたDNA配列が用いられるが、通常レポーター遺伝子の発現が最も高いクローンから得られたDNA配列が用いられる。

目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列（例えば、部分N末端アミノ酸配列）をコードするDNA配列の下流に、目的蛋白質の残余部分をコードするDNA（例えば、中央部からC末端に至るアミノ酸配列をコードするDNA）配列を有するDNAを調製する。目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAはレポーター遺伝子の発現が最も高いクローンから得られたDNA断片であっても良く、化学合成されたものであっても良い。目的蛋白質の残余部分をコードするDNAは、cDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよく、化学合成されたものであってもよい。また、目的蛋白質の残余部分をコードする限り、天然型DNA配列と塩基配列が異なってもよい。

目的蛋白質の全長をコードするDNAは、上記で得られた目的蛋白質の部分アミノ酸配列をコードするDNA断片と目的蛋白質の残余部分をコードするDNA断片を連結することによって調製することができる。両DNA断片の連結は公知の方法に従って行うことができる。

本発明の製造法によって得られる目的蛋白質を工業的に製造できるDNAとしては、例えば、

（1）本発明の製造法で得られた、レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質の全長をコードする非天然型DNA

A、

- (2) 本発明の製造法で得られた、レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の部分アミノ酸配列をコードするDNAの3'末端側または(および)5'末端側に、当該目的蛋白質の残余アミノ酸配列をコードするDNAを連結することにより調整された、当該目的蛋白質の全長をコードする非天然型DNAなどが挙げられる。

目的蛋白質の全長をコードする非天然型DNAとは、目的蛋白質の全長をコードする天然に存在するDNAと完全に同一な配列を含まないことを意味する。

より具体的には、以下のDNAが挙げられる。

- 10 (1) ラットGALPの場合
配列番号：119で表わされる塩基配列を有するDNA。
(2) MPIF-1Δ23の場合
配列番号：120で表わされる塩基配列を有するDNA。
(3) ZAQ-1リガンドの場合
15 配列番号：121で表わされる塩基配列を有するDNA。
(4) ラットGALPの場合
配列番号：122で表わされる塩基配列を有するDNA。

- 得られた目的蛋白質の全長をコードするDNAを、宿主細胞で機能するプロモーターを保持するベクター中のプロモーターの下流に組み込み、得られた組換えベクターで原核細胞を形質転換することによって、目的蛋白質を発現できる形質
20 転換体を得ることができる。

得られた形質転換体を培養することによって、目的蛋白質を製造することができる。

- ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、
25 λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる

5。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

レポーター遺伝子は公知の方法に従って、ベクター中のプロモーターDNAの下流に挿入することができる。目的蛋白質の全長または部分アミノ酸配列をコードするDNAの挿入のために、通常プロモーターDNAの下流かつレポーター遺伝子の

25 伝子上流の一つまたは複数（好ましくは2または3個）の制限酵素認識部位を設けることができる。

ベクターには、以上の他に、所望により選択マーカーを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子（

Amp^r)、テトラサイクリン耐性遺伝子等があげられる。

目的蛋白質の部分配列をコードするDNAまたは目的蛋白質をコードするDNAが挿入された組換えベクターを用いて、宿主を形質転換させることによって形質転換体を製造することができる。

- 5 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440 (1954)] などが用いられる。

10

15

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

- 20 酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

- 25 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Manestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用

いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217(1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr-)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

15。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソーズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養

に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5-8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15-43℃で約3-24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30-40℃で約6-24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)」や0.5% カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)」が挙げられる。培地のpHは約5-8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃-35℃で約24-72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に

非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2-6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3-5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5
5 -20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・
10 ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6-8であるのが好ましい。培養は通常約30℃-40℃で約15-60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

上記培養物から目的蛋白質を分離・精製するには、例えば、下記の方法により
15 行なうことができる。

目的蛋白質を培養菌体から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの
20 の蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に目的蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的蛋白質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの
25 の公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の

差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

このようにして得られる目的蛋白質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって前記した塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する目的蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼなどが用いられる。

抽出した目的蛋白質または分離・精製した目的蛋白質は必要により、蛋白質のリフォールディングに付される。リフォールディングは、例えば蛋白質のフォールディング、R. H. Pain編、245-279 (1995)、シュプリンガーフェアラーク東京に記載された公知の方法あるいはそれに準じる方法により実施する事が可能である。抽出剤（例えば、グアニジン塩酸塩、尿素のようなカオトロピック可溶化剤、nラウリルメチルグリシン、SDSのような界面活性剤など）を含まないもしくは低濃度の抽出剤を含む緩衝液で1段階もしくは他段階での希釈や、半透膜を用いた透析、ゲル濾過を用いた緩衝液の置換等により行うことが出来る。この場合、目的蛋白質のアグリゲーションを防止するために、アルギニン、ポリエチレングリコール、中性界面活性剤等を添加することが出来る。蛋白質のジスルフィド結合形成のために空気酸化、酸化還元緩衝液系等を用いることが出来る。酸化還元緩衝液にはグルタチオン、システイン、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、またはシステアミンをベースとしたものが挙げられる。

さらに、EP 0 812 856号に記載の方法に準じて目的蛋白質のN末端のメチオニンを除去することもできる。

得られた目的蛋白質は、該蛋白質の性質によって異なるが、たとえば医薬、試薬、原料、飼料などとして使用することができる。

目的蛋白質を医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができ

る。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤技術にしたがって製造することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジル

アルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- このようにして得られる製剤は、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
15	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	M	: AまたはC
	R	: GまたはA
20	W	: AまたはT
	S	: GまたはC
	Y	: TまたはC
	K	: GまたはT
	V	: AまたはGまたはC
25	H	: AまたはCまたはT
	D	: AまたはGまたはT
	B	: GまたはCまたはT
	N	: AまたはCまたはGまたはT
	RNA	: リボ核酸

	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
5	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
10	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
15	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
20	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
25	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

プライマー1のDNA配列を示す。

〔配列番号：2〕

5 プライマー2のDNA配列を示す。

〔配列番号：3〕

合成DNA1のDNA配列を示す。

〔配列番号：4〕

合成DNA2のDNA配列を示す。

10 〔配列番号：5〕

合成DNA3のDNA配列を示す。

〔配列番号：6〕

合成DNA4のDNA配列を示す。

〔配列番号：7〕

15 合成DNA5のDNA配列を示す。

〔配列番号：8〕

合成DNA6のDNA配列を示す。

〔配列番号：9〕

プライマー3のDNA配列を示す。

20 〔配列番号：10〕

プライマー4のDNA配列を示す。

〔配列番号：11〕

プライマー5のDNA配列を示す。

〔配列番号：12〕

25 プライマー6のDNA配列を示す。

〔配列番号：13〕

プライマー7のDNA配列を示す。

〔配列番号：14〕

合成DNA7のDNA配列を示す。

〔配列番号：15〕

合成DNA8のDNA配列を示す。

〔配列番号：16〕

プライマー8のDNA配列を示す。

5 〔配列番号：17〕

合成DNA9のDNA配列を示す。

〔配列番号：18〕

合成DNA10のDNA配列を示す。

〔配列番号：19〕

10 合成DNA11のDNA配列を示す。

〔配列番号：20〕

合成DNA12のDNA配列を示す。

〔配列番号：21〕

ラットGALPのN末端15アミノ酸残基のアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：22〕

ラットGALPのN末端15アミノ酸残基をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 1から得られた塩基配列を示す。

20 〔配列番号：24〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 2から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 3から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

25 実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 4から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 5から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 6から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 7から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 8から得られた塩基配列を示す。

5 〔配列番号：31〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 9から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 10から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

10 実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 11から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 12から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 13から得られた塩基配列を示す。

15 〔配列番号：36〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 14から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 15から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

20 実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 16から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 17から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

実施例2で得られた大腸菌クローンNo. 18から得られた塩基配列を示す。

25 〔配列番号：41〕

MP I F 1 Δ 2 3のN末端5アミノ酸残基のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：42〕

MP I F 1 Δ 2 3のN末端5アミノ酸残基をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 1から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 2から得られた塩基配列を示す。

5 〔配列番号：45〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 3から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 4から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

10 実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 5から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 6から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 7から得られた塩基配列を示す。

15 〔配列番号：50〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 8から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：51〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 9から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

20 実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 10から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：53〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 11から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 12から得られた塩基配列を示す。

25 〔配列番号：55〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 13から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 14から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：57〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 15から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：58]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 16から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：59]

5 実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 17から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：60]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 18から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：61]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 19から得られた塩基配列を示す。

10 [配列番号：62]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 20から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：63]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 21から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：64]

15 実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 22から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：65]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 23から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：66]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 24から得られた塩基配列を示す。

20 [配列番号：67]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 25から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：68]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 26から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：69]

25 実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 27から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：70]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 28から得られた塩基配列を示す。

[配列番号：71]

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 29から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：72〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 30から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：73〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 31から得られた塩基配列を示す。

5 〔配列番号：74〕

実施例5で得られた大腸菌クローンNo. 32から得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：75〕

合成DNA13の塩基配列を示す。

〔配列番号：76〕

10 合成DNA14の塩基配列を示す。

〔配列番号：77〕

合成DNA15の塩基配列を示す。

〔配列番号：78〕

合成DNA16の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：79〕

合成DNA17の塩基配列を示す。

〔配列番号：80〕

合成DNA18の塩基配列を示す。

〔配列番号：81〕

20 合成DNA19の塩基配列を示す。

〔配列番号：82〕

合成DNA20の塩基配列を示す。

〔配列番号：83〕

合成DNA21の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：84〕

合成DNA22の塩基配列を示す。

〔配列番号：85〕

合成DNA23の塩基配列を示す。

〔配列番号：86〕

- 合成DNA 24 の塩基配列を示す。
〔配列番号：87〕
- 合成DNA 25 の塩基配列を示す。
〔配列番号：88〕
- 5 合成DNA 26 の塩基配列を示す。
〔配列番号：89〕
- 合成DNA 27 の塩基配列を示す。
〔配列番号：90〕
- 合成DNA 28 の塩基配列を示す。
10 〔配列番号：91〕
- 合成DNA 29 の塩基配列を示す。
〔配列番号：92〕
- 合成DNA 30 の塩基配列を示す。
〔配列番号：93〕
- 15 合成DNA 31 の塩基配列を示す。
〔配列番号：94〕
- 合成DNA 32 の塩基配列を示す。
〔配列番号：95〕
- 合成DNA 33 の塩基配列を示す。
20 〔配列番号：96〕
- 合成DNA 34 の塩基配列を示す。
〔配列番号：97〕
- 合成DNA 35 の塩基配列を示す。
〔配列番号：98〕
- 25 合成DNA 36 の塩基配列を示す。
〔配列番号：99〕
- 合成DNA 37 の塩基配列を示す。
〔配列番号：100〕
- 合成DNA 38 の塩基配列を示す。

[配列番号：101]

合成DNA39の塩基配列を示す。

[配列番号：102]

合成DNA40の塩基配列を示す。

5 [配列番号：103]

合成DNA41の塩基配列を示す。

[配列番号：104]

合成DNA42の塩基配列を示す。

[配列番号：105]

10 合成DNA43の塩基配列を示す。

[配列番号：106]

合成DNA44の塩基配列を示す。

[配列番号：107]

合成DNA45の塩基配列を示す。

15 [配列番号：108]

合成DNA46の塩基配列を示す。

[配列番号：109]

合成DNA47の塩基配列を示す。

[配列番号：110]

20 合成DNA48の塩基配列を示す。

[配列番号：111]

合成DNA49の塩基配列を示す。

[配列番号：112]

合成DNA50の塩基配列を示す。

25 [配列番号：113]

合成DNA51の塩基配列を示す。

[配列番号：114]

合成DNA52の塩基配列を示す。

[配列番号：115]

合成DNA 53の塩基配列を示す。

[配列番号：116]

GPR8リガンドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：117]

- 5 ZAQ-1リガンドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：118]

bFGF CS23ムテインのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：119]

- 10 本発明の製造法で得られたラットGALPをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：120]

本発明の製造法で得られたMPIF-1Δ23をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：121]

- 15 本発明の製造法で得られたZAQ-1リガンドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：122] 本発明の製造法で得られたラットGALPをコードするDNAの塩基配列を示す。

- 20 後述の実施例1で用いられたプラスミドpTCHGH-Naを保持する形質転換体エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) (MM294 (DE3), pTCHGH-Na) は、1997年12月10日から茨城県つくば市東1丁目1-1
中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に寄託番号FERM
25 BP-6888として、また1997年10月16日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17-85の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO
16124として寄託されている。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) JM109/pGFPNPは、2000年7月17日から独立行政法人産業

技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に寄託番号FERM BP-7223として、また2000年4月24日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16426として寄託されている。

- 5 後述の実施例3で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）MM294（DE3）／pTFCRGALは、2000年7月17日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に寄託番号FERM BP-7226として、また2000年4月24日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託
10 番号IFO 16429として寄託されている。

- 後述の実施例4で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）MM294（DE3）／pTFC S4は、2000年7月17日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に寄託番号FERM BP-7227とし
15 て、また2000年4月24日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16430として寄託されている。

- 後述の実施例8で用いられたプラスミドpTCII／d23-MPIF1を保持する形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）MM294（DE3）／pTCII d23-MPIF1は、1998年11月24日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に寄託番号FERM BP-6582として、また1998年10月27日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16212として寄託されている。
- 20

- 後述の実施例8で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）JM109／pNPMPIFは、2000年7月17日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に寄託番号FERM BP-7224として、また2000年4月24日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16427として寄託されている。
- 25

後述の実施例9で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pNPMP1FNOは、2000年7月17日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に寄託番号FERM BP-7225として、
5 また2000年4月24日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16428として寄託されている。

後述の実施例12で用いられたプラスミドpHMITGを保持する形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pHMITGは、平成12年7月13日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に寄託番号FERM
10 BP-7220として、平成12年5月26日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16441として寄託されている。

後述の実施例12で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) MM294 (DE3) /pTCIIZAQNは、2001年5月24日から
15 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7608として、また2001年5月15日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16627として寄託されている。

後述の実施例13で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) MM294 (DE3) /pTCIIZAQSは、2001年5月24日から
20 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7609として、また2001年5月15日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16628として寄託されている。

後述の実施例15で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) MM294 (DE3) /pTCIIZAQNOは、2001年5月24日から
25 ら独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7610として、また2001年5月15日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16629として寄託されている。

後述の実施例17で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) MM294 (DE3) /pTCRGDEは、2001年5月24日から独立

行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7612として、また2001年5月17日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16631として寄託されている。

後述の実施例18で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）MM294（DE3）／pTCRGNODEは、2001年5月24日から
5 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7614として、また2001年5月17日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16633として寄託されている。

後述の実施例20で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）MM294（DE3）／pTCRGTODEは、2001年5月24日から
10 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7613として、また2001年5月17日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16632として寄託されている。

15 実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）に記載されている方法に従った。

20 実施例1 至適化配列探索用プラスミドの構築

1) プラスミドpGFPuvqcの構築

pGFPuv（クロンテック社）のGFPuv構造遺伝子内に存在するNde I 切断部位を消失させるためにプライマー1：CGTTATCCGGATCACATGAAACGGCATG（配列番号：1）及びプライマー2：CATGCCGTTTCATGTGATCCGGATAACG（配列番号：2）を用いて部位特異的変異導入（QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit, STRATAGENE社製）により77番目のヒスチジンのコドン（CAT）からCACに置換し、プラスミドpGFPuvqcを得た。

2) プラスミドpGFPuvqdの構築

プラスミドpGFPuvqcをHindIII（宝酒造）及びKpnI（宝酒

造)で切断し、アガロース電気泳動により約3.3 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いてDNAを回収した。合成DNA 1 : AGCTTCATATGTTCTGAAGTACTAGATCTGGTAC (配列番号: 3) 及び合成DNA 2 : CAGATCTAGTACTTCTGAACATATGA (配列番号: 4) 各100 pmolをTE緩衝液に溶解し、90℃で10分間保持した後に室温まで徐冷しアニーリングを行った。このアニーリングを行ったDNA断片をpGFPuvqcのHindIII-KpnI部分にLigation kit ver. 2 (宝酒造)を用いて挿入し、プラスミドpGFPuvqdを得た。

3) プラスミドpGFPNPの構築

WO 00/20439の参考例1に記載のpTCHGH-NaのT7プロモーターを合成プロモーターNP2に置換したプラスミドpNPHGHを以下のように構築した。プラスミドpTCHGH-NaをEcoRI (宝酒造) 及びXbaI (宝酒造)で切断し、アガロース電気泳動により約4.6 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いてDNAを回収した。合成プロモーターNP2を含む合成DNA 3 : AATTCTATAAAAATAATTGTTGACATATTTTATAAATTTTGGCATAATAGATCTAATTGTGAGCGGATAACAATTCTGCAGAAGCTTGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT (配列番号: 5) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 4 : CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCAAGCTTCTGCAGAATTGTTATCCGCTCACAATTAGATCTATTATGCCAAAATTATAAAATATGTCAACAATTATTTTATAG (配列番号: 6) を各100 pmolをTE緩衝液に溶解し、90℃で10分間保持した後に室温まで徐冷しアニーリングを行った。この二本鎖DNA断片をpTCHGH-NaのEcoRI-XbaI部分にLigation kit ver. 2 (宝酒造)を用いて挿入し、プラスミドpNPHGHを得た。

プラスミドpNPHGHをBamHI (宝酒造)で切断し、DNA Blunting Kit (宝酒造)を用いて末端部分を平滑化した。次にNdeIで切断した後、アガロース電気泳動により約4.6 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いてDNAを回収した。プラスミドpGFPuvqdをNdeI及びStuIで切断し、アガロース電気泳動により約0.8 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いてGF

Puvの構造遺伝子を含むDNAを回収した。回収したDNAをpNPHGHのNde I-BamH I（平滑化）部分にLigation kit ver. 2（宝酒造）を用いて挿入し、N末端至適化配列選択用プラスミドpGFPNPを得た（図1）。

プラスミドpGFPNPはNP2プロモーターにより転写されるGFPuv構造遺伝子を含み、GFPuv構造遺伝子の上流にNde I、Sca I及びAge I切断部位を有する発現プラスミドであり、これらの制限酵素部位を利用してDNA断片を挿入することが出来る。

プラスミドpGFPNPを用いて大腸菌JM109を形質転換し、大腸菌JM109/pGFPNPを得た。

10

実施例2 ラットGALP発現用至適化配列の探索

pGFPNPをNde I（宝酒造）及びSca I（宝酒造）で切断し、アガロース電気泳動により約4.9kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いてDNAを回収した。

15 ラットGALP（ラット・ガラニンレセプターに対するラット型リガンドペプチド（1-60）；WO99/48920）のN末端部アミノ酸をコードするランダム塩基配列は以下のように調製を行った。混合塩基を含む合成DNA5：AGGTAACCAGCACTATTTAAAGTCCANCCNCCNCGNCGRTGNGCNGGNGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAG（配列番号：7）及び合成DNA6：AGGTAACCAGCACTATTTAAAGTCCANCCNCCYCT
20 NCCYCTRTGNGCNGGNGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAG（配列番号：8）を鋳型として、プライマー3：CTTTAAGAAGGAGATATACATATG（配列番号：9）をプライマーとして用いてPfu DNA polymerase（STRATAGENE）により二本鎖DNAを調製した。該伸長反応液はPfu DNA polymerase を5 μ L、添付の10x Reaction buffer 及びdNTP mixture（宝酒造）を各5 μ L、合成DNA3（42.2 μ mol/L）、合成DNA4（5
25 μ mol/L）及びプライマー3（100 μ mol/L）を各1 μ L、蒸留水を32 μ L加えて調製した。該伸長反応は94℃・30秒間 58℃・30秒間 70℃20分間により行った。伸長反応後の反応液をマイクロコン30（日本ミリポア社）を用いて濃縮及び脱塩を行なった後に、Nde I（宝酒造）により二本鎖DNAの切断を行った。Nde Iによる二本鎖DNAの切断は以下のように行った。濃縮・脱塩後の反応液10

μ L、Buffer H（宝酒造） 2 μ L、蒸留水7 μ L及びNde I 1 μ Lからなる反応液を37℃で3時間保持し切断反応を行った。このNde I切断後の反応液からQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いてDNA断片を精製した。このDNA断片をpGFPNP2のNde I-Sca I部分にLigation kit ver. 2（宝酒造）を用いて挿入し、GFPuvのN末端部分にラットGALPのN末端部分アミノ酸をコードするランダム塩基配列を有する発現プラスミドpGFPNPRGを構築した（図2）。

この発現プラスミドpGFPNPRGを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、10 mg/Lのテトラサイクリンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養しコロニーを形成させた。形成したコロニーを354 nmのUVランプ下で観察し、強い蛍光を発するコロニー：2株、弱い蛍光を示すコロニー：16株を選択した。このコロニーをプライマー4：TTCATACACGGTGCCTGACTGCGTTAG（配列番号：10）及びプライマー5：TCAACAAGAATTGGGACAACCTCC（配列番号：11）を用いてコロニーPCRを行い、アガロース電気泳動により目的のDNA断片の挿入を確認した。またコロニーPCRの産物をQIAquick PCR Purification Kit（キアゲン）を用いて精製し、プライマー4及びプライマー5を用いて塩基配列分析を行った結果、表1に示す塩基配列が得られた。これらのうちNo. 1及びNo. 2の塩基配列は強い蛍光を示す大腸菌クローンから得られたものである。

20 表1

天然型配列	残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	アミノ酸	Ala	Pro	Ala	His	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Trp	Thr	Leu	Asn	Ser
	塩基	GCA	CCT	GCT	CAC	AGG	GGA	CGA	GGA	GGC	TGG	ACC	CTC	AAT	AGT
得られた大腸菌クローンから塩基配列	No. 1	GCT	CCA	GCG	CAT	CGT	GGG	CGT	GGT	GGT	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
	No. 2	GCA	CCT	GCA	CAT	CGT	GGG	CGA	GGA	GGC	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
	No. 3	GCA	CCA	CAC	GCA	CGC	GGA	CGA	GGG	GGA	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
	No. 4	GCA	CCA	GCA	CAC	AGA	GGA	AGG	GGC	GGA	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
	No. 5	GCA	CCA	GCT	CAC	CGA	GGC	CGA	GGA	GGC	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
	No. 6	GCA	CCC	GCT	CAC	CGC	GGA	CGT	GGA	GGC	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
	No. 7	GCA	CCA	GCA	CAT	AGA	GGA	AGA	GGA	GGC	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT

No. 8	GCA	CCG	GCA	CAC	CGC	GGA	CGA	GGG	GGT	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 9	GCA	CCG	GCG	CAC	CGC	GGA	CGT	GGC	AGA	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 10	GCC	CCA	GCA	CAT	CGC	GGA	CGT	GGC	GGA*	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 11	GCC	CCA	GCA	CAC	CGC	GGT	CGC	GGC	GGT	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 12	GCT	CCA	GCA	CAC	CGG	GGG	CGG	GGG	GGA	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 13	GCA	CCG	GCA	CAC	CGC	GGC	CGC	GGA	GGA	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 14	GCG	CCA	GCT	CAT	CGG	GGT	CGT	GGC	GGG	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 15	GCT	CCA	GCT	CAT	CGA	GGA	CGC	GGC	GGT	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 16	GCG	CCA	GCA	CAC	CGT	GGC	CGA	GGC	GGC	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 17	GCA	CCG	GCG	CAC	CGC	GGA	CGT	GGC	AGA	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT
No. 18	GCC	CCA	GCG	CAT	CGG	GGG	CGT	GGC	GGC	TGG	ACT	TTA	AAT	AGT

実施例3 天然型塩基配列ラットGALP発現株の構築

ラットGALP発現プラスミドは以下のように、T7プロモータによりラットGSLP-CS23融合蛋白質として発現が行われるプラスミドpTFCRGALを構築した(図3)。

- WO99/48920の実施例21に記載のプラスミドpTFCをNdeI及びAvaIで切断し、アガロース電気泳動により約3.9 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。
- ラットGALP構造遺伝子をクローニングしたプラスミドpGR2RL4 (WO99/48920の実施例18) よりラットGALR2L構造遺伝子上流に開始コドンATG及びNdeI認識部位を有するプライマー6: AGCATATGGCACCTGCTCACAGG (配列番号: 12) 及びGALP構造遺伝子下流にシステインをコードするTGC及びAvaI認識部位を有するプライマー7: CCCTCGGGGAGGTCATCCTTGAGAG (配列番号: 13) を用いてPCR反応によりラットGALR2L構造遺伝子を含む断片を増幅した。この断片をTOPO TA Cloning Kit を用いてクローニングを行いプラスミドpCR2.1TOPO/rGALを取得した。プラスミドpCR2.1TOPO/rGALをNdeI及びAvaIで切断し、アガロース電気泳動により約0.2 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。このDNA断片をpTFCのNdeI-AvaI部分にLigation kit ver.2 (宝酒造) を用いてライゲーション

ンを行ない、プラスミド pTFCRGAL を得た。このプラスミドには、実施例 2 の No. 1 の塩基配列を含み、かつ ラット GALP をコードする塩基配列を有する DNA (配列番号: 119) が含まれている。

5 発現プラスミド pTFCRGAL を用いて大腸菌 MM294 (DE3) の形質転換を行い、rGAL-CS23 融合蛋白質発現能を有する大腸菌 MM294 (DE3) / pTFCRGAL を得た。

実施例 4 ラット GALP 発現用至適化配列を用いた発現

pTFCRGAL のラット GALP 構造遺伝子の N 末端部分の塩基配列を天然
10 型塩基配列から実施例 2 で強い蛍光を発するコロニーから得られた塩基配列への置換は以下のように行った (図 4)。

天然型塩基配列をコードするラット GALP-CS23 発現プラスミド pTFCRGAL を XbaI 及び EcoO65I で切断し、アガロース電気泳動により約 4.5 kbp のバンドを切り出し、ゲルより QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて DNA を回収した。実施例 2 で得られたコロニー No. 1 の株を 15 10 mg / l のテトラサイクリンを含む LB 培地に接種し、37℃で一晩培養し、得られた菌体より QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン) を用いてプラスミド pGFPNP / rGAL1 を精製した。このプラスミド pGFPNP / rGAL1 を XbaI 及び EcoO65I で切断し、アガロース電気泳動により約 0.1 kbp のバン
20 ドを切り出し、ゲルより QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて DNA を回収した。この DNA 断片を pTFCRGAL の XbaI-EcoO65I 部分に Ligation kit ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、実施例 2 で選択した No. 1 のクローンから得られた塩基配列をラット GALP の N 末端部分に有するラット GALP-CS23 融合蛋白質の発現プラスミド pTFCS4 を得た。
25

発現プラスミド pTFCS4 を用いて大腸菌 MM294 (DE3) の形質転換を行い、rGALP-CS4 融合蛋白質発現能を有する大腸菌 MM294 (DE3) / pTFCS4 を得た。

実施例5 天然型及び至適化配列ラットGALPの発現量の比較

- 実施例3及び4で得られたラットGALP-CS23融合蛋白質発現大腸菌MM294 (DE3) / pTFCRGAL及びMM294 (DE3) / pTFCS4を10mg/lのテトラサイクリンを含むLB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) 1リットルで30℃、16時間培養した。得られた培養液各75mlを1.5リットルの主発酵用培地(1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素ナトリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.024%硫酸マグネシウム、0.02%ニューポールLB-625、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.0%カザミノ酸、1.0%イーストエキス)を仕込んだ31
- 10 容ジャー培養槽に移植して、37℃、通気量16L/min、攪拌回転数200rpmで通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約1200クレット単位になった時点で、5.95mg/l分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加した。IPTG添加後24分、130分及び200分後に0.75%のグルコースを添加し培養開始9時間後まで培養を行った(図5)。
- 15 経時的に0.2mlの培養液を抜き取り、12000rpmで10分間遠心分離を行い、上清を廃棄して得られた菌体をSDS-PAGEによりラットGALP-CS23の発現確認を行った。培養液0.2mlから得られた菌体にサンプルバッファ(125mM Tris-HCl、1%ドデシル硫酸ナトリウム、15%グリセロール、5%2-メルカプトエタノール、0.005%ブロムフェノールブルー)で懸濁し、95
- 20 ℃5分間加熱処理した後、マルチゲル15/25(第一化学薬品)で電気泳動を行った。泳動後のゲルをラピッドCBB KANTO(関東化学)で染色を行ったところ、ラットGALPのN末端部分が天然型塩基配列からなる発現プラスミドを保有する大腸菌MM294 (DE3) / pTFCRGALよりも、実施例2で選択したNo. 1の塩基配列からなる発現プラスミドを保有する大腸菌MM294 (
- 25 DE3) / pTFCS4においてラットGALP-CS23融合蛋白質の高い発現が認められた(図6)。

実施例6 MPIF-1Δ23発現用至適化配列の探索

pGFPNPをNde I (宝酒造) 及びSca I (宝酒造) で切断し、アガロ

ース電気泳動により約4.9kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。

MP1F-1Δ23 (Myeloid progenitor inhibitory factor-1Δ23; WO 95/17092) のN末端部アミノ酸をコードするランダム塩基配列は以下のように調製
5 を行った。混合塩基を含む合成DNA 7 : GGGATGCTTCGTGGGGTGTAGGAGATGCAGCAGT
CAGCACTAGTNGCARTGRAAYCTRCCATATGTTGGCGCGCCTT (配列番号 : 14) 及び合成DNA
A 8 : GGGATGCTTCGTGGGGTGTAGGAGATGCAGCAGTCAGCACTAGTNGCARTGRAANGRTCCATATGT
TGGCGCGCCTT (配列番号 : 15) を1対2の割合で混合した物を鋳型として用い、
プライマー 8 : AAGGCGCGCCAACATATG (配列番号 : 16) を用いてPyrobest DNA p
10 olymerase (宝酒造) により二本鎖DNAを調製した。該伸長反応液はPyrobest
DNA polymerase (5U/μL) を3μL、添付の10xReaction bufferを10μL、dNTP
mixtureを16μL、合成DNA 7 (1 μg/μL) を0.5μL、合成DNA 8 (1 μg/
μL) を1μL、プライマー 8 (100 μmol/L) を2μL、蒸留水を67.5μL加えて調製
した。該伸長反応は94℃・30秒間 58℃・30秒間 70℃5分間により行った。伸長
15 反応後の反応液よりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNA
断片を精製した後、Nde I (宝酒造) により二本鎖DNAの切断を行った。N
de I による二本鎖DNAの切断は以下のように行った。精製したDNA断片溶
液27μL、Buffer H (宝酒造) 3.5μL、蒸留水1.5μL及びNde I 3μLからなる
反応液を37℃で2時間保持し切断反応を行った。70℃で15分間保持しN
20 de I を失活させマイクロコン10 (日本ミリポア社) を用いて濃縮及び脱塩を
行なった後に、このDNA断片をpGFPNPのNde I - Sca I 部分にLiga
tion kit ver. 2 (宝酒造) を用いて挿入し、至適化塩基配列探索用プラスミドp
GFPNPMPを構築した (図7)。

このプラスミドを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、10mg/lのテ
25 トラサイクリンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養しコロニーを形
成させた。形成したコロニーを354nmのUVランプ下で観察し、強い蛍光を
発するコロニー : 2株、弱い蛍光を示すコロニー : 15株、蛍光を発しないコロ
ニー : 1株を選択した。このコロニーを10mg/lのテトラサイクリンを含むLB
培地0.5mlに接種した。37℃で一晩培養した後、各コロニー培養液50

ml を予め生理食塩水 150 ml を分注しておいた 96 ウェルマイクロプレートに移した後、650 nm の吸光度 (A_{650}) を 96 マイクロプレートリーダー (Molecular Device) で測定し、励起波長: 355 nm、測定波長: 538 nm における蛍光強度をマルチプレート蛍光測定装置 (大日本製薬) により測定した。蛍光強度を吸光度で割った値を GFP 発現効率として示した。またこのコロニーをプライマー 4 及びプライマー 5 を用いてコロニー PCR を行い、アガロース電気泳動により目的の DNA 断片の挿入を確認した。またコロニー PCR の産物を QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製し、プライマー 4 及びプライマー 5 を用いて塩基配列分析を行った結果、表 2 に示す塩基配列が得られた。また、いくつかのクローンにおいて天然型 MPIF-1 Δ 23 の塩基配列をもつクローンより強い蛍光を示した (表 2、図 11)。

表 2

天然型配列	残基	1	2	3	4	5	GC含量 (%)	蛍光強度 ／濁度
	アミノ酸	Asp	Arg	Phe	His	Ala		
	塩基	GAC	AGA	TTC	CAC	GCT		
大腸菌クローンから得られた塩基配列	1	GAC	AGA	TTC	CAC	GCA	53.3	644
	2	GAC	AGA	TTC	CAC	GCC	60.0	533
	3	GAC	AGA	TTC	CAT	GCA	46.7	669
	4	GAC	AGA	TTT	CAC	GCA	46.7	543
	5	GAC	AGA	TTT	CAC	GCC	53.3	526
	6	GAC	AGA	TTT	CAC	GCG	53.3	646
	7	GAC	AGG	TTC	CAC	GCA	60.0	375
	8	GAC	AGG	TTC	CAC	GCG	66.7	391
	9	GAC	AGG	TTT	CAC	GCT	60.0	455
	10	GAC	AGG	TTT	CAT	GCC	53.3	456
	11	GAC	CGA	TTC	CAC	GCG	66.7	765
	12	GAC	CGA	TTC	CAC	GCT	60.0	1005
	13	GAC	CGA	TTC	CAC	GCC	60.0	1006
	14	GAC	CGA	TTC	CAT	GCG	60.0	874
	15	GAC	CGA	TTC	CAT	GCT	53.3	791
	16	GAC	CGA	TTT	CAT	GCC	53.3	988
	17	GAC	CGC	TTC	CAC	GCC	73.3	872
	18	GAC	CGC	TTC	CAC	GCG	73.3	1013
	19	GAC	CGC	TTC	CAC	GCT	66.7	653
	20	GAC	CGC	TTT	CAC	GCA	60.0	497
	21	GAC	CGG	TTC	CAC	GCA	66.7	378
	22	GAC	CGG	TTC	CAT	GCC	66.7	391
	23	GAC	CGG	TTT	CAC	GCA	60.0	477
	24	GAT	AGA	TTC	CAC	GCT	46.7	940
	25	GAT	AGA	TTT	CAC	GCC	46.7	403
	26	GAT	AGA	TTT	CAC	GCG	46.7	821
	27	GAT	AGA	TTT	CAC	GCT	40.0	718
	28	GAT	AGG	TTC	CAC	GCT	53.3	662
	29	GAT	CGA	TTT	CAC	GCA	53.3	1126
	30	GAT	CGC	TTC	CAC	GCA	66.7	751
	31	GAT	CGC	TTT	CAC	GCT	53.3	610
	32	GAT	CGG	TTC	CAC	GCA	60.0	412

実施例7 プラスミドpNPHGH1actsの構築

実施例1で構築したpNPHGHをMscIで切断したのち、Bacterial Alkaline Phosphatase (ニッポンジーン) により末端部分の脱リン酸化を行った。pET11a (宝酒造) をNaeIで切断し、アガロース電気泳動により約1.6 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。このlacIを含むDNA断片をpNPHGHのMscI切断部分にLigation kit ver.2 (宝酒造) を用いて挿入し、プラスミドpNPHGH1acを得た。さらにT7ターミネーター部分を合成ターミネーターに置換するために以下の操作を行った。プラスミドpNPHGH1acをEspI及びPvuIで切断しアガロース電気泳動により約6.1 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。合成DNA9: TGAGCATGCATACTAGTCTCGAGTAATCCCACAGCCGCCCGCCAGTTCGCTGGCGGCGGCATTTTCGAT (配列番号: 17) 及び合成DNA10: CGAAAATGCCGCCGCAGCGGAAGTGGCGGCGGCTGTGGGATTACTCGAGACTAGTATGCATGC (配列番号: 18) を各100 pmolをTE緩衝液に溶解し、90℃で10分間保持した後に室温まで徐冷しアニリングを行った。このDNAをpNPHGH1acのEspI-PvuI部分にLigation kit ver.2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、プラスミドpNPHGH1actsを得た (図8)。

20 実施例8 天然型塩基配列MPIF-1Δ23発現株の構築

プラスミドpNPHGH1actsをEspIで切断した後、DNA Blunting Kit (宝酒造) を用いて末端部分を平滑化し、さらにNdeIで切断した。アガロース電気泳動により約3.9 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。WO00/40610の参考例1に記載のpTCII/d23-MPIF1をBamHIで切断した後、DNA Blunting Kit (宝酒造) を用いて末端部分を平滑化し、さらにNdeIで切断した。アガロース電気泳動により約240 bpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。このDNAをpNPHGH1actsのNdeI-EspI (平滑化) 部分にLigation

kit ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、天然型MP I F-1 Δ 2 3 発現プラスミドpNPMP I Fを得た (図9)。このプラスミドで大腸菌JM 1 0 9 コンピテントセル (東洋紡) の形質転換を行い、MP I F-1 Δ 2 3 発現能を有する大腸菌JM 1 0 9 / pNPMP I Fを得た。

5

実施例9 至適化配列MP I F-1 Δ 2 3 発現株の構築

実施例8で得られたpNPMP I FをNde I (宝酒造) 及びSpe I (宝酒造) で切断した、アガロース電気泳動により約4. 8 k b pのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した

10 。実施例7でNo. 29のクローンで得られた塩基配列を含む合成DNA 1 1 : T ATGGATCGATTTCACGCAA (配列番号: 19) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 1 2 : CTAGTTGCGTGAAATCGATCCA (配列番号: 20) 各100 pmolをTE緩衝液に溶解し、90℃で10分間保持した後に室温まで徐冷しアニーリングを行った。この二本鎖DNA断片をpTC I I / d 2 3 -MP I FのNde I -Spe

15 I 部分にLigation kit ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、プラスミドpTC I I / MP I FNOを得た。pTC I I / MP I FNOをBamH I で切断した後、DNA Blunting Kit (宝酒造) を用いて末端部分を平滑化し、さらにNde I で切断した。アガロース電気泳動により約240 b pのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回

20 収した。このDNAをpNPHGHk a c t sのNde I -Esp I (平滑化) 部分にLigation kit ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、改変型塩基配列をN末端部分に有するMP I F-1 Δ 2 3 発現プラスミドpTC I I / MP I FNOを得た (図10)。このプラスミドには、実施例6のNo. 29の塩基配列を含み、かつMP I F-1 Δ 2 3 をコードする塩基配列を有するDNA

25 (配列番号: 120) が含まれている。

このプラスミドで大腸菌JM 1 0 9 コンピテントセル (東洋紡) の形質転換を行い、MP I F-1 Δ 2 3 発現能を有する大腸菌JM 1 0 9 / pNPMP I FNOを得た。

実施例10 天然型及び至適化配列MP I F-1 Δ 23の発現量の比較

- 実施例6で得られたMP I F-1 Δ 23発現大腸菌JM109/pNPMP I F及びJM109/pNPMP I FNOを10mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) 1
5 リットルで30℃、16時間培養した。得られた培養液各75mlを1.5リットルの主発酵用培地(1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素ナトリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.024%硫酸マグネシウム、0.02%ニューボールLB-625、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.0%カザミノ酸、1.0%イーストエキス)
10 を仕込んだ3L容ジャー培養槽に移植して、37℃、通気量16L/min、攪拌回転数200rpmで通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約4500クレット単位になった時点で、5.95mg/l分のイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加した。IPTG添加後24分、130分及び200分後に0.75%のグルコースを添加し培養開始23時間後まで培養を行
15 った。経時的に0.2mlの培養液を抜き取り、12000rpmで10分間遠心分離を行い、上清を廃棄して得られた菌体よりMP I F-1 Δ 23を抽出し、ELISA法によりMP I F-1 Δ 23の発現量の測定を行った。培養液0.2mlから得られた菌体を400 μ Lの100mM Tris-HCl (pH7)で懸濁し、その50 μ Lに400 μ Lの抽出バッファー(100mM Tris-HCl (pH7) + 2.5% SDS)を加え、超音
20 波細胞破碎装置BIORUPTOR(オリンパス社)を用いて5分間超音波破碎を行ないMP I F-1 Δ 23を抽出した。MP I F-1 Δ 23のELISAは一次抗体として抗MP I F-1抗体(ダコジャパン社)を用い、Sulfo-NHS-Biotin(フナコシ社)によりビオチン化した同抗体を二次抗体として用いて下記の通り行った。96穴マイクロプレート(ヌンク社)の各ウェルに4 μ g/mLの抗MP I F1抗体を含むコー
25 ティングバッファー(0.293%炭酸水素ナトリウム、0.159%炭酸ナトリウムアジ化ナトリウム)100 μ Lを分注し4℃で一晩放置した。各ウェルを洗浄バッファー(PBS + 0.1% Tween 20)で洗浄した後、希釈バッファー(PBS + 10% Block Ace + 0.1% Tween 20 + 0.02% Merthiolate)で希釈したMP I F-1 Δ 23抽出液を各ウェルに50 μ Lを加え室温で2時間放置した。各ウェルを洗浄バッファ

ーで洗浄した後、希釈バッファーで希釈したビオチン化抗MP I F-1抗体 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液100 μL を加え室温で1時間放置した。各ウェルを洗浄バッファーで洗浄した後、アルカリフォスファターゼストレプトアビジン (ベクター社) を洗浄バッファーで500倍に希釈した液100 μL を加え室温で1時間放置した。各ウェルを洗浄バッファーで洗浄した後、Bluephos Microwell Phosphatase Substrate System (KPL社) を用いて37℃で20分間反応を行い、2.5%EDTA・4Na溶液を100 μL を加えて反応を停止した。マイクロプレートリーダー (ラプシステムズ社) を用いて620 nmの吸光度を測定した。スタンダードとしてはWO 00/40610に記載の方法で調製したMP I F-1 Δ 23を用いた。培養経過及び発現量を測定した結果を図12に示した。MP I F-1 Δ 23の発現においても、本方法により実施例6で選択した塩基配列をN末端に有するものは天然型塩基配列を含むものより高い発現が認められた。

15

実施例11 高発現配列探索用プラスミドpKMNPの構築

カナマイシン耐性遺伝子の発現によるカナマイシン耐性を用いた高発現配列の探索用プラスミドpKANPの構築は以下のとおり行った (図13)。

プラスミドpACYC177 (和光純薬株式会社) を制限酵素Nhe I 及びXho I で切断し、アガロース電気泳動により約3.6 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (株式会社キアゲン) を用いてDNAを回収した。合成DNA13: CTAGCGAATTCGAGCATATGAGCACTAGTGCATGCGAGCCATATTC AACGGGAAACGCTTGC (配列番号: 75) 及び合成DNA14: TCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCGCATGCACTAGTGTCTCATATGCTCGAATTTCG (配列番号: 76) 各100 pmolをTE緩衝液に溶解し、90℃で10分間保持した後に室温まで徐冷しアニーリングを行った。このアニーリングを行ったDNA断片をpACYC177のNhe I-Xho I 部分にLigation kit ver. 2 (宝酒造) を用いて挿入し、カナマイシン耐性遺伝子上流に制限酵素EcoRI及びSphI切断部位を導入したプラスミドpACYCMI Iを得た。

25

プラスミド pACYCMII を EcoRI 及び SphI で切断し、アガロース電気泳動により約 3.6 kbp のバンドを切り出し、ゲルより QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて DNA を回収した。実施例 1 で得られた pGFPNP を EcoRI 及び NdeI で切断し、アガロース電気泳動により約 0.15 kbp のバンドを切り出し、ゲルより QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて DNA を回収した。合成 DNA 15 : TATGAGGGTACCGCCGGCTGCATG (配列番号 : 77) 及び合成 DNA 16 : CAGCCGGCGGTACCCTCA (配列番号 : 78) 各 100 pmol を TE 緩衝液に溶解し、90℃ で 10 分間保持した後に室温まで徐冷しアニーリングを行った。このアニーリングを行った DNA 断片及び pGFPNP の EcoRI-NdeI 断片を、pACYCMII の EcoRI-SphI 部分に Ligation kit ver. 2 (宝酒造) を用いて挿入し、プラスミド pKMNP を得た。

プラスミド pKMNP を NdeI 及び SphI で切断し、アガロース電気泳動により約 3.8 kbp のバンドを切り出し、ゲルより QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて DNA を回収した。合成 DNA 17 : TATGAGGGTACCGCCGGCACTGCATG (配列番号 : 79) 及び合成 DNA 18 : CACTGCCGGCGGTACCCTCA (配列番号 : 80) 各 1 µg を 100 µL のリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl₂, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mL ウシ血清アルブミン、1mM ATP、10ユニット T4ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン)] 中で 37℃、1 時間反応させ、5' 末端のリン酸化をおこない、90℃ で 10 分間保持した後に室温まで徐冷しアニーリングを行った。この DNA 断片を pKMNP の NdeI-SphI 部分に Ligation kit ver. 2 (宝酒造) を用いて挿入し、プラスミド pKANP を得た。このプラスミドのカナマイシン構造遺伝子の上流に存在する制限酵素 NdeI 及び NgoMI V 部分に目的とする蛋白質の N 末端アミノ酸配列をコードするランダム塩基配列を導入することにより、発現効率の高い塩基配列をカナマイシン耐性を指標として選択することが可能である。

実施例 12 天然型塩基配列 ZAQ-1 リガンド発現用プラスミドの構築

天然型塩基配列を構造遺伝子とする ZAQ-1 リガンド発現用プラスミドは以

下のとおり構築した。

- 図14にアミノ酸配列及び天然型塩基配列を示したZ A Q-1リガンド構造遺伝子は、プラスミドp H M I T Gより構造遺伝子上流に隣接してN d e I切断部位及びメチオニンを持つ合成DNA 19 : CTCATATGGCTGTGATCACCGGTGCCTGTG (配列番号 : 81) と、下流に隣接して終始コドン及びB a m H I切断部位を持つ合成DNA 20 : GCGGATCCCTAAAAATTGATGTTCTTCAAG (配列番号 : 82) を用いて、PCRで増幅した。この遺伝子をTOPO TA Cloning Kit (インヴィトロジェン社) を用いてp C R I I-TOPOベクターに連結し、p C R I I/GALを作成した。このプラスミドをTOP10 One Shotコンピテントセルに形質転換し、X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactose) を塗布した50 μ g/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地 (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、2%寒天) 上に播き、37℃で1日培養し、テトラサイクリン耐性と β ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。この形質転換体を50 μ g/mLのアンピシリンを含むLB培地 (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン) を用いてプラスミドp C R I I-TOPO h1 Z A Qを回収した。このプラスミドp C R I I-TOPO h1 Z A Qを制限酵素N d e I及びB a m H Iで切断し、アガロース電気泳動により約0.3 k b pのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。
- WO 00/40610に記載されているプラスミドp T C I Iを制限酵素N d e I及びB a m H Iで切断し、アガロース電気泳動により約4.6 k b pのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。プラスミドp T C I IのN d e I-B a m H I部分に上記により調製したZ A Q-1リガンドの構造遺伝子を含むDNA断片をLigation kit ver 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、天然型塩基配列を有するZ A Q-1リガンド発現プラスミドp T C I I Z A Q Nを得た。

プラスミドp T C I I Z A Q Nを大腸菌MM294 (DE3) 株に形質転換を行い、10 μ g/mLのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1日培養し、高コドン使用頻度塩基配列を有するZ A Q-1リガンド発現株MM294

(DE 3) / p T C I I Z A Q Nを得た (図 1 5)。

実施例 1 3 高コドン使用頻度塩基配列 Z A Q - 1 リガンド発現用プラスミドの構築

- 5 大腸菌において使用頻度の高いコドンを用いた構造遺伝子を有する発現プラスミドを構築した。大腸菌に於けるコドンの使用頻度はCodon Usage Data Base (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)に記載されている各コドンの使用頻度を参考に、図 1 6 に示した塩基配列を Z A Q - 1 リガンドの構造遺伝子として用いた。図 1 6 において上段が Z A Q - 1 リガンドのアミノ酸配列、中段が Z A Q - 1 リ
- 10 ガンドをコードする天然型塩基配列そして下段が使用頻度の高いコドンを用いた塩基配列を示す。Z A Q - 1 リガンド構造遺伝子の作成は以下のように行った (図 1 8)。

- 図 1 7 に示す 6 種類の DNA 断片 (合成 DNA 2 1 : TATGGCGGTGATTACCGGTGCGTGC GAACGTGATGTGCAGTGC GGTGCGGGTACCTGCTGCGCGATTAGCCTGTGGCTGCGTGGTCTG (配列
- 15 番号 : 8 3)、合成 DNA 2 2 : CGTATGTGCACCCCGCTGGGTCGTGAAGGTGAAGAATGCCATCCGGGTAGCCATAAAGTGCCGTTCTTCCGTAAACGTAAACATCATACCTG (配列番号 : 8 4)、合成 DNA 2 3 : CCCGTGCCTGCCGAACCTGCTGTGCAGCCGTTTCCCGGATGGTCGTTATCGTTGCAGCATGGATCTGAAAAACATTAACCTTTTAGG (配列番号 : 8 5)、合成 DNA 2 4 : CACATACGCAGACCACGCAGCCACAGGCTAATCGCGCAGCAGGTACCCGCACCGCACTGCACATCACGTTTCGCACGCACC
- 20 GGTAATCACCGCCA (配列番号 : 8 6)、合成 DNA 2 5 : AGGCACGGGCAGGTATGATGTTTACGTTTACGGAAGAACGGCACTTTATGGCTACCCGGATGGCATTCTTCACCTTCACGACCCAGCGGGGTG (配列番号 : 8 7)、合成 DNA 2 6 : GATCCCTAAAAGTTAATGTTTTTCAGATCCATGCTGCAACGATAACGACCATCCGGGAAACGGCTGCACAGCAGGTTCGGC (配列番号 : 8 8) を用いた。

a) DNAオリゴマーのリン酸化

- 25 5' 末端になるべき合成 DNA 2 1 及び合成 DNA 2 6 を除いた 4 種類の合成 DNA 各 1 μ g を 100 μ L のリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl₂, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mL ウシ血清アルブミン、1mM ATP、10ユニット T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン)] 中で 37℃、1 時間反応させ、5' 末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水

層を回収し2倍量のエタノールを加え、 -70°C に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

b) DNAフラグメントの連結

上記a)で得られたリン酸化DNAフラグメントと合成DNA 21及び合成DNA 26各 $1\mu\text{g}$ を合わせ $120\mu\text{L}$ とした。この混合液を 80°C で10分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った。TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2 (宝酒造)を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液 $30\mu\text{L}$ にI液 $30\mu\text{L}$ を加え良く混合した後、I液 $60\mu\text{L}$ を加え、 37°C 、1時間反応させ、ライゲーションを行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、 -70°C に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

c) 5'末端のリン酸化

沈殿をTE緩衝液(10mM Tris-HCl ($\text{pH}8.0$), 1mM EDTA) $10\mu\text{L}$ に溶解し、 $100\mu\text{L}$ のリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl ($\text{pH}7.6$), 10mM MgCl_2 , 1mM スペルミジン、 10mM ジチオスレイトール、 0.1mg/mL ウシ血清アルブミン、 1mM ATP、10ユニット T4ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン)] 中で 37°C 、1時間反応させ、5'末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、 -70°C に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させ、 $20\mu\text{L}$ のTE緩衝液に溶解した。

d) 発現プラスミド pTCII ZAQ Sの構築

実施例12に記載のpTCIIプラスミドのNdeI-BamHI断片に、上記により調製したZAQ-1リガンド構造遺伝子をTaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2 (宝酒造)を用いてライゲーション反応を行った。すなわちpTCIIのNdeI-BamHI断片溶液 $1\mu\text{L}$ とZAQ-1リガンドの構造遺伝子溶液 $4\mu\text{L}$ を混合し、I液 $5\mu\text{L}$ を加え、 16°C 、30分間反応させ、ライゲーションを行った。ライゲーション液 $10\mu\text{L}$ を用いて大腸菌JM109コンピテントセル (東洋紡) を形質転換し、 $10\mu\text{g/mL}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、 37°C で1日培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晚培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン)を用いてプラスミドpTCII ZAQ Sを調製した。このZAQ-1リガンド構造遺伝子部

分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpTCIIZAQSを大腸菌MM294 (DE3) 株に形質転換を行い、10 µg/mLのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1日培養し、大腸菌において使用頻度の高いコドンからなる塩基配列を有するZAQ-1リガンド発現株MM294 (DE3) / pTCIIZAQSを得た。

実施例14 ZAQ-1リガンド発現至適化配列の探索

実施例11で構築したpKANPを制限酵素NdeI (宝酒造) 及びNgoMI V (NEW ENGLAND BIO LABS社) で切断し、アガロース電気泳動により約3.8 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。

ZAQ-1リガンドのN末端部アミノ酸をコードするランダム塩基配列は以下のように調製を行った。混合塩基を含む合成DNA27: AGAGTTTGCCGGCACC GGTC
15 CCGTACCGCACC GCACTGCACRT CNGYT C RCANGC NCCNGT DATNACNGCCATATGTTGGCGC (配列番号: 89) 及び合成DNA28: AGAGTTTGCCGGCACC GGTC CCGTACCGCACC GCACTGCAC
RTCYCTYT C RCANGC NCCNGT DATNACNGCCATATGTTGGCGC (配列番号: 90) を1対2の割合で混合した物を鋳型として用い、合成DNA29: GCGCCAACATATG (配列番号: 91) を用いてPyrobest DNA polymerase (宝酒造) により二本鎖DNAを調製
20 した。該伸長反応液はPyrobest DNA polymerase (5U/µL) を3µL、添付の10x reaction bufferを10µL、dNTP mixtureを16µL、合成DNA35 (1 µg/µL) を0.5µL、合成DNA36 (1 µg/µL) を1µL、合成DNA29 (100 µmol/L) を2µL、蒸留水を67.5µL加えて調製した。該伸長反応は94℃・30秒間-58℃・30秒間-70℃・5分間により行った。伸長反応後の反応液よりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNA断片を精製した後、NdeI
25 I (宝酒造) 及びNgoMI V (NEW ENGLAND BIO LABS社) により二本鎖DNAの切断を行った。NdeI及びNgoMI Vによる二本鎖DNAの切断は以下のように行った。

精製したDNA断片溶液27µL、Buffer 4 (NEW ENGLAND BIO LABS社) 3.5µL

、蒸留水1.5 μ L、*Nde* I 1.5 μ L及び*Ngm* IV 1.5 μ Lからなる反応液を37℃で2時間保持し切断反応を行った。アガロース電気泳動により約70bpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。このDNA断片をpKANPの*Nde* I - *Ngm* IV部分にLigation kit ver. 2 (宝酒造) を用いて挿入し、至適化塩基配列探索用プラスミドpKANP ZAQを構築した(図19)。プラスミドpKANP ZAQを用いて大腸菌MM294株の形質転換を行い、50 μ g/mLのカナマイシンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1日培養し、コロニーを形成させた。このコロニーを合成DNA 30 : ACCTGATTGCCCCGACATTATCGC (配列番号 : 92) 及び合成DNA 31 : CACCCTCATCAGTGCCAACATAG (配列番号 : 93) を用いてコロニーPCRを行い、アガロース電気泳動により目的のDNA断片の挿入を確認した。またコロニーPCRの産物をQIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製し、合成DNA 30 及び合成DNA 31 を用いて塩基配列分析を行った結果、図20に示す塩基配列が得られた。

15

実施例15 発現至適化塩基配列ZAQ-1リガンド発現用プラスミドの構築

実施例13で得られた使用頻度の高いコドンを用いたZAQ-1リガンド発現プラスミドpTCII ZAQ Sを制限酵素*Xba* I (宝酒造) 及び*Kpn* I (宝酒造) で切断し、アガロース電気泳動により約4.8kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。

実施例14で得られたコロニーPCRの産物を制限酵素*Xba* I (宝酒造) 及び*Kpn* I (宝酒造) で切断し、アガロース電気泳動により約100bpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。このDNA断片をpTCII ZAQ Sの*Xba* I - *Kpn* I部分にLigation kit ver. 2 (宝酒造) を用いて挿入し、塩基配列を発現用に至適化したZAQ-1リガンド発現プラスミドpTCII ZAQ NOを構築した。このZAQ-1リガンド構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル3100DNAシーケンサーを用いて確認した。このプラスミドには、図20

の下段の塩基配列を含み、かつZ A Q-1ペプチドをコードする塩基配列を有するDNA（配列番号：121）が含まれている。プラスミドp T C I I Z A Q N Oを大腸菌MM294（DE3）株に形質転換を行い、10 μ g/mLのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37 $^{\circ}$ Cで1日培養し、大腸菌における発現用
5 に至適化した塩基配列を有するZ A Q-1リガンド発現株MM294（DE3）
／p T C I I Z A Q N Oを得た（図21）。

実施例16 Z A Q-1リガンド発現株の発現量の比較

実施例12、実施例13及び実施例15で得られたZ A Q-1リガンド発現株
10 MM294（DE3）／p T C I I Z A Q N、MM294（DE3）／p T C I
I Z A Q S及びMM294（DE3）／p T C I I Z A Q N Oを10mg/Lのテトラ
サイクリンを含むLB培地（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリ
ウム）30mlで30 $^{\circ}$ C、16時間培養した。得られた培養液各1mlを19m
1の主発酵用培地（1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素ナトリウ
ム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.024%硫酸マグネシウム
15 ム、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖及び1.0%カザミノ酸）を仕込んだ20
0ml容ヒダ付きマイヤーに移植して、37 $^{\circ}$ C、200rpmで攪拌培養を開始
した。培養液の濁度が約150クレット単位になった時点で、終濃度0.1mmole/L
分のイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加した。
20 IPTG添加後3時間後まで培養を行った。

培養終了後に0.2mLの培養液を抜き取り、12000rpmで10分間遠心分離
を行い、上清を廃棄して得られた菌体にサンプルバッファー（125 mM Tris-HCl
、1%ドデシル硫酸ナトリウム、15%グリセロール、5%2-メルカプトエタ
ノール、0.005%ブロムフェノールブルー）で懸濁し、95 $^{\circ}$ C5分間加熱処理した
25 後、マルチゲル15/25（第一化学薬品）で電気泳動を行った。泳動後のゲルをラビ
ッドCBB KANTO（関東化学）で染色を行ったところ、Z A Q-1リガン
ドのN末端部分が天然型塩基配列からなる発現プラスミドを保有する大腸菌MM
294（DE3）／p T C I I Z A Q N及び大腸菌において使用頻度の高いコド
ンからなる塩基配列を有するZ A Q-1リガンド発現株MM294（DE3）／

pTCIIZAQSよりも、大腸菌における発現用に至適化した塩基配列を有するZAQ-1リガンド発現株MM294 (DE3) / pTCIIZAQNOが高いZAQ-1リガンド発現能を示した(図22)。このことから本方法により見出される塩基配列を用いた構造遺伝子は、使用頻度の高いコドンを使用した塩基配列を用いた構造遺伝子よりも発現に適している事が明らかとなった。

実施例17 ラットGALP直接発現用プラスミドの構築(天然型塩基配列)

天然型塩基配列からなる構造遺伝子を有するラットGALP直接発現プラスミドは以下のように構築した(図23)。

WO00/20439の参考例1に記載のpTCHGH-Naを制限酵素Nde I及びBamHIで切断し、アガロース電気泳動により約4.6 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いてDNAを回収し、発現用ベクターとして用いた。

実施例3で得られたラットGALP融合蛋白質発現プラスミドpTFCRGALよりラットGALP構造遺伝子部分を増幅した。pTFCRGALのT7プロモーター部分に相当するプライマーとして合成DNA32: TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号: 94) 及びラットGALPのC末端の下流にSTOPコドン及びBamHI切断部位を導入したプライマーとして合成DNA33: ATACATGGATCC TCAGGTCATCCTTGGAGAGC (配列番号: 95) を用いた。pTFCRGALプラスミド 50 ng、プライマー各200 pmole、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 1 uL、添付のdNTP溶液 8 uL及び添付のx10反応緩衝液 10 uLを含む100 uL中で、94℃・10秒-55℃・30秒-72℃・60秒で25サイクル増幅を行った。増幅後の反応液よりQIAquick PCR Purification kit (キアゲン)を用いて増幅されたDNA断片を精製した。精製したDNA断片を制限酵素Nde I (宝酒造) 1 uL及びBamHI (宝酒造) 1 uL、Buffer K (宝酒造) 5 uLを含む反応液30 uL中で37℃・12時間反応した。4%アガロース電気泳動により約0.2 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いてDNAを回収した。このDNA断片をpTCHGH-NaのNde I-BamHI部分にLigation kit v

er. 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、ラットGALP直接発現用の発現プラスミドpTCRGDEを得た。

発現プラスミドpTCRGDEを用いて大腸菌MM294 (DE3) の形質転換を行い、大腸菌MM294 (DE3) / pTCRGDEを得た。

5

実施例18 ラットGALP直接発現用プラスミドの構築 (N末端塩基配列至適化)

実施例2で見出した発現用に至適化した塩基配列でN末端部分を置き換えた構造遺伝子を有するラットGALP直接発現プラスミドは以下のように構築した (図24)。

10

実施例4で得られたラットGALP融合蛋白質発現プラスミドpTFCS4を鋳型として用いた以外は実施例17と同様にして、ラットGALP直接発現用の発現プラスミドpTCRGNODEを得た。発現プラスミドpTCRGNODEを用いて大腸菌MM294 (DE3) の形質転換を行い、大腸菌MM294 (DE3) / pTCRGNODEを得た。

15

実施例19 GALP発現用全長至適化配列の探索

実施例2で行ったN末端部分の塩基配列だけでなく他の部分の塩基配列に関しても同様にして至適化配列の探索を行った。60アミノ酸からなるラットGALPの配列を4つのブロックに分け実施例2で実施したN末端以外の各ブロックの塩基配列を実施例2と同様にして発現至適化配列を探索した。その結果、図25に示した塩基配列が得られた。

20

実施例20 全長至適化配列GALP発現プラスミドの構築

実施例17で見いだした塩基配列を有するラットGALPの発現プラスミドは以下のように構築した (図26)。

25

合成DNA34 : TATGGCTCCAGCGCATCGTGGGCGTGGTGGTTGGACTTTAAATAGTGCTGGATACTTGTTAGGTCCAGTGTTACATTTAAGCAGCAAAGCAAACCAGGGC (配列番号 : 96)、合成DNA35 : AGGAAGACAGACTCAGCTCTTGAGATCCTAGATCTGTGGAAGGCCATAGATGGGCTTCCTTA

TTCTCGGTCTCCCCGCATGACGTGAG (配列番号：97)、合成DNA36：TTGCTTTGCT
GCTTAAATGTAACACTGGACCTAACAAGTATCCAGCACTATTTAAAGTCCAACCACCACGCCACGATGCGC
TGGTGCCA (配列番号：98) 及び合成DNA37：GATCCTCACGTCATGCGGGGAGACCG
AGAATAAGGAAGCCCATCTATGGCCTTCCACAGATCTAGGATCTCAAGAGCTGAGTCTGTCTTCCTGCCCTG
5 GT (配列番号：99) を用いてラット GALP の構造遺伝子を構築した。合成D
NA34 37 を各 50 mmol/L の濃度でTE緩衝液に溶解し、合成DNA 3 μ L を1
00 μ L のリン酸化反応液[50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl₂, 1mM スペルミジ
ン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mLウシ血清アルブミン、1mM ATP、10ユニ
ット T4ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン)] 中で37℃、1時間反応さ
10 せ、5'末端のリン酸化を行った。リン酸化した合成DNA34及び合成DNA3
6または合成DNA35及び合成DNA37を混合し、95℃で10分保持した
後に室温まで徐冷し、アニーリングを行った。アガロース電気泳動により約0.
1 kbp のバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン
) を用いてDNAを回収し、ラット GALP のN末側及びC末側に相当する二本
15 鎖DNAを調製した。

実施例17に記載のpTCHGH-NaのNdeI-BamHI断片と上記で
調製したラットGALPのN末側及びC末側に相当する二本鎖DNAを混合し、L
igation kit ver. 2 (宝酒造) を用いて結合し、全長塩基配列を発現用に至適化し
たラットGALP直接発現プラスミドpTCRGTODEを構築した。このプラ
20 スミドには、図25の下段の塩基配列を含み、かつラットGALPをコードする
塩基配列を有するDNA (配列番号：122) が含まれている。発現プラスミド
pTCRGTODEを用いて大腸菌MM294 (DE3) の形質転換を行い、大
腸菌MM294 (DE3) /pTCRGTODEを得た。

25 実施例21 全長至適化配列GALPの直接発現

実施例17で得られた大腸菌MM294 (DE3) /pTCRGDE、実施例
18で得られた大腸菌MM294 (DE3) /pTCRGNODE及び実施例2
0で得られた大腸菌MM294 (DE3) /pTCRGTODEを10mg/Lのテト
ラサイクリンを含むLB培地 (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリ

- ウム) 1リットルで30℃、16時間培養した。得られた培養液各75mlを1.5リットルの主発酵用培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、0.02%ニューボールLB-625)を仕込んだ3L容ジャー培養槽に移植して、37℃、通気量1.5L/min、攪拌回転数550rpmで通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約150クレット単位になった時点で、50μmol/L分のイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加した。経時的に0.2mlの培養液を抜き取り、12000rpmで10分間遠心分離を行い、上清を廃棄して得られた菌体にサンプルバッファー(125mM Tris-HCl、1%ドデシル硫酸ナトリウム、15%グリセロール、5%2メルカプトエタノール、0.005%ブロムフェノールブルー)で懸濁し、95℃5分間加熱処理した後、マルチゲル15/25(第一化学薬品)で電気泳動を行った。泳動後のゲルをラピッドCBB KANTO(関東化学)で染色を行ったところ、ラットGALPの構造遺伝子すべてが天然型塩基配列からなる発現プラスミドを保有する大腸菌MM294(DE3)/pTCRGDE及びN末端部分のみ至適化した塩基配列を有するラットGALP発現株MM294(DE3)/pTCRGNODEでは、SDS PAGE上でラットGALPのバンドは認められなかった。ラットGALP構造遺伝子全体にわたって大腸菌における発現用に至適化した塩基配列を有するラットGALP発現株MM294(DE3)/pTCRGTODEではラットGALPのバンドが認められた。図27にMM294(DE3)/pTCRGDE及びMM294(DE3)/pTCRGTODEの結果を示す。このように比較的低分子の蛋白質質の発現において天然型塩基配列において直接発現が困難な場合においても本法を用いて塩基配列を発現用に至適化することによって、直接発現が可能になることが期待できる。また、N末端部分の至適化のみでは期待する発現が得られない場合には、構造遺伝子全長にわたって適用することにより高い発現が可能であることが示された。

実施例22 動物細胞発現効率測定用プラスミドの構築

1) プラスミドpQBI25-2の構築

pQBI25(宝酒造)のGFP構造遺伝子下流のマルチクローニングサイト

内に存在するEcoRI、EcoRV、NotI、XbaI、ApaI切断部位を消失させるためにBamHI（宝酒造）及びApaI（宝酒造）で切断し、DNA Blunting Kit（宝酒造）を用いて末端部分を平滑化した。続いてアガロース電気泳動により約6.1 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction kit（キアゲン）を用いてDNAを回収し、Ligation Kit Version. 2（宝酒造）を用いて連結し、プラスミドpQBI25-2を得た。プラスミドpQBI25-2をSacII（宝酒造）およびNheI（宝酒造）で切断し、アガロース電気泳動により約6.1 kbpのバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction kit（キアゲン）を用いてDNAを回収した。EcoRI、AgeI切断部位を含む合成DNA38：GGAATTCGCTCGCACC GG TAGAAAAAATGG（配列番号：100）及びその相補塩基配列を含む合成DNA39：CTAGCCATTTTCTACCGGTGCGAGCGAATTCGCG（配列番号：101）を各100 pmolをTE緩衝液に溶解し、90℃で10分間保持した後に室温まで徐冷しアニーリングを行った。この二本鎖DNA断片をpQBI25-2のSacII-NheI部分にLigation Kit Version. 2（宝酒造）を用いて挿入し、プラスミドpQBI25-3を得た（図28）。

プラスミドpQBI25-3は真核細胞においてCMVプロモーターにより転写されるGFP構造遺伝子を含み、GFP構造遺伝子上流にSacII、EcoRI、AgeI切断部位を有する発現プラスミドであり、これらの制限酵素部位を利用してDNA断片を挿入することが出来る。

実施例23 N末端アミノ酸部分の塩基配列によるGFP発現量の比較用発現プラスミドの構築

ヒトLLPL（Lecithin cholesterol acyltransferase-like lysophospholipase、Biochem Biophys Res Commun. 257巻、50（1999））のN末端から13番目のアミノ酸残基に至るアミノ酸配列をコードする7種類の塩基配列をGFP構造遺伝子上流に有する発現プラスミドは以下のように調製を行った。#1は天然型塩基配列である（図29）。

実施例22で得られたプラスミドpQBI25-3をEcoRI（宝酒造）お

よびA g e I (宝酒造) で切断し、アガロース電気泳動により約6. 1 k b p のバンドを切り出し、ゲルよりQIAquick Gel Extraction kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。

- 以下に示した合成DNAは各50 pmolをTE緩衝液に溶解し、T4 Polynucleotide Kinase (和光純薬) により5'末端のリン酸化を行った。#1は合成DNA 40 : AATTCGTCGTACACCATGGGCCTCCACCTCCGCCCTACCGTGTGGGGCTGCTC (配列番号 : 102) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 41 : CCGGAGCAGCCCCACACGGTAGGGGCGGAGGTGGAGGCCCATGGTGTACGACGG (配列番号 : 103) の5'末端のリン酸化反応液を混合し、90℃で10分間保持した後に室温まで徐ろしアニーリングを行った。この二本鎖DNA断片をpQBI25-3のEcoRI-AgeI部分にLigation Kit Version. 2 (宝酒造) を用いて挿入し、プラスミドpQBI25-3 L L P L #1を得た。#2は合成DNA 42 : AATTCGTCGTACACCATGGGCCTGCACCTCGGCCCTACCGGTGGGCCTGCTG (配列番号 : 104) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 43 : CCGGCAGCAGGCCCCACCCGGTAGGGCCGAGGTGCAGGCCCATGGTGTACGACGG (配列番号 : 105)、#3は合成DNA 44 : AATTCGTCGTACACCATGGGACTTCACCTTAGACCTTACAGAGTGGGACTTCTT (配列番号 : 106) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 45 : CCGGAAGAAGTCCCACTCTGTAAGGTCTAAGGTGAAGTCCCATGGTGTACGACGG (配列番号 : 107)、#4は合成DNA 46 : AATTCGTCGTACACCATGGGTCTACATCTACGTCCGTATCGTGTAGGTCTACTA (配列番号 : 108) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 47 : CCGGTAGTAGACCTACACGATACGGACGTAGATGTAGACCCATGGTGTACGACGG (配列番号 : 109)、#5は合成DNA 48 : AATTCGTCGTACACCATGGGGCTACATCTACGCCCGTATCGCGTAGGGCTACTA (配列番号 : 110) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 49 : CCGGTAGTAGCCCTACCGGATACGGGCGTAGATGTAGCCCATGGTGTACGACGG (配列番号 : 111)、#6は合成DNA 50 : AATTCGTCGTACACCATGGGTCTACATCTTAGACCCTATCGTGTAGGACTGCTT (配列番号 : 112) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 51 : CCGGAAGCAGTCTACACGATAGGGTCTAAGATGTAGACCCATGGTGTACGACGG (配列番号 : 113)、#7は合成DNA 52 : AATTCGTCGTACACCATGGGTCTACATCTTAGACCCTACCGAGTTGGATTGCTT (配列番号 : 114) 及びその相補塩基配列を含む合成DNA 53 : CCGGAAGCAATCCAACCTCGGTAGGGTCTAAGATGTAGACCCATGGTGTACGACGG

CGG (配列番号: 1 1 5) をそれぞれ用いて # 1 と同様の操作でプラスミド p Q B I 2 5 - 3 # 2 - 7 を得た。

5 実施例 2 4 動物細胞の一過性発現における N 末端部分に異なる塩基配列を有する G F P 発現量の比較

実施例 2 3 で得られた p Q B I 2 5 - 3 # 1 - 7 を用いて 2 4 ウェルプレートで培養した C O S - 7 細胞の形質転換を LipofectAmine PLUS (Gibco BRL) により付属の手順書に従って行い、転換 4 2 時間後に励起波長: 4 3 5 nm、測定波長: 5 3 8 nm における蛍光強度をマルチプレート蛍光測定装置 (大日本製薬) に
10 より測定した。その結果、天然型 L L P L の N 末端部塩基配列を持つ # 1 より # 2 - 7 の塩基配列が総じて高い蛍光を示した。また、N 末端部分の各塩基配列によりレポーター遺伝子である G F P の発現量の変動することが示された (図 3 0)

15 実施例 2 5 動物細胞の安定発現における N 末端部分に異なる塩基配列を有する G F P 発現量の比較

実施例 2 3 で得られた p Q B I 2 5 - 3 L L P L # 1 - 7 をアンピシリン耐性遺伝子内に存在する S c a I (宝酒造) で切断し、直鎖状 DNA を得た。通常の培養を行った C H O - K 1 細胞をはがして P B S で洗浄後、 1×10^7 個 / 0 .
20 8 ml になるよう P B S に懸濁して p Q B I 2 5 - 3 L L P L # 1 - 7 の直鎖状 DNA $10 \mu g$ を添加し、氷中に 5 分間静置した。続いてエレクトロポレーション装置 (Bio-Rad) を用いて、 $960 \mu F$ 、 $250 V$ の電圧をかけて形質転換を行い、氷中に 1 0 分間静置した後に培地に戻し培養した。転換 3 0 時間後に Geneti cin (Gibco BRL) を $0.8 mg/ml$ の濃度で添加した培地に細胞をまき直して
25 培養を続け耐性株を選択した。転換 1 3 日後に細胞をはがしてフローサイトメトリー (FALCON) を用いて $488 nm$ のアルゴンレーザーにより励起される一つの細胞の蛍光を $530 nm$ のフィルターを持つ検出器で測定した。各発現プラスミド形質転換細胞につき 10000 個の細胞を測定し、検出器の光電子増倍管の電圧を $500 V$ にしたときの蛍光強度の実測値が 1 0 1 以上を示す細胞の個数により



GFP発現量の比較を行った。その結果、天然型LLPLのN末端部塩基配列を持つ#1と比較して#3-7の塩基配列は同程度かそれ以下、#2では2倍以上の細胞数であった。動物細胞の安定発現においてもN末端部分の各塩基配列によりレポーター遺伝子であるGFPの発現量が変動することが示された(図31)

5 。

産業上の利用可能性

本発明によれば、目的蛋白質を遺伝子組換え技術を用いて大量に産生させることができ、目的蛋白質の工業的製造法として有用である。また、本発明によれば
10 、目的蛋白質を大量に産生する形質転換体を簡便に取得することができる。

請求の範囲

1. 1) 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードする複数種のDNAの混合物を用いて、各DNAを宿主細胞で機能するプロモーターDNAおよび
5 レポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつ該レポーター遺伝子の上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、
2) 該組換えベクターで宿主細胞を形質転換し、
3) 得られた形質転換体を培養し、
4) レポーター遺伝子の発現を測定し、
10 5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質をコードするDNAを調製することを特徴とする、発現に適した目的蛋白質をコードするDNAの製造法。
2. 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列が目的蛋白質の全長もしくはN
15 末端を含む部分アミノ酸配列である請求項1記載の製造法。
3. 1) 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードする複数のDNAの混合物を用いて、各DNAを宿主細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつ該レポーター遺伝子の上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、
20 2) 該組換えベクターで宿主細胞を形質転換し、
3) 得られた形質転換体を培養し、
4) レポーター遺伝子の発現を測定し、
5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、
25 かつ目的蛋白質をコードするDNAを含有する組換えベクターを調製し、
6) 該組換えベクターで宿主細胞を形質転換し、
7) 形質転換体を培養することを特徴とする、目的蛋白質またはその塩を製造する方法。
4. 目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列が目的蛋白質の全長もしくはN

末端を含む部分アミノ酸配列である請求項2記載の製造法。

- 5 5. 1) 真核生物由来の目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードする複数のDNAの混合物を用いて、各DNAを原核細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつレポーター遺伝子上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、
 - 2) 該組換えベクターで原核細胞を形質転換し、
 - 3) 得られた原核細胞形質転換体を培養し、
 - 4) レポーター遺伝子の発現を測定し、
 - 5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の
- 10 N末端アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質をコードするDNAを調製することを特徴とする、原核細胞における発現に適した真核生物由来の目的蛋白質をコードするDNAの製造法。
6. 1) 真核生物由来の目的蛋白質のN末端アミノ酸配列をコードする複数のDNAの混合物を用いて、各DNAを原核細胞で機能するプロモーターDNAおよびレポーター遺伝子を保持するベクター中の該プロモーターDNAの下流かつ該
- 15 レポーター遺伝子上流に組み込んだ組換えベクターを調製し、
 - 2) 該組換えベクターで原核細胞を形質転換し、
 - 3) 得られた原核細胞形質転換体を培養し、
 - 4) レポーター遺伝子の発現を測定し、
 - 5) レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の
- 20 N末端アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質をコードするDNAを含有する組換えベクターを調製し、
 - 6) 該組換えベクターで原核細胞を形質転換し、
 - 7) 原核細胞形質転換体を培養することを特徴とする、真核生物由来の目的蛋白質またはその塩を原核細胞において製造する方法。
- 25 7. 請求項1記載の製造法で得られた、レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の全長もしくは部分アミノ酸配列をコードするDNAと同一の塩基配列を含有し、かつ目的蛋白質の全長をコードする非天然型DNA。

8. 請求項1記載の製造法で得られた、レポーター遺伝子の高い発現が確認された形質転換体が有する目的蛋白質の部分アミノ酸配列をコードするDNAの3'末端側または(および)5'末端側に、当該目的蛋白質の残余アミノ酸配列をコードするDNAを連結した、目的蛋白質の全長をコードする非天然型DNA。
- 5 9. 配列番号:119、配列番号:120、配列番号:121または配列番号:122で表わされる塩基配列を有するDNA。
10. 請求項7~9のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター。
11. 請求項10記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
12. 請求項11記載の形質転換体を培養し、目的蛋白質を生成せしめることを
- 10 特徴とする目的蛋白質またはその塩の製造法。

1/31

☒ 1

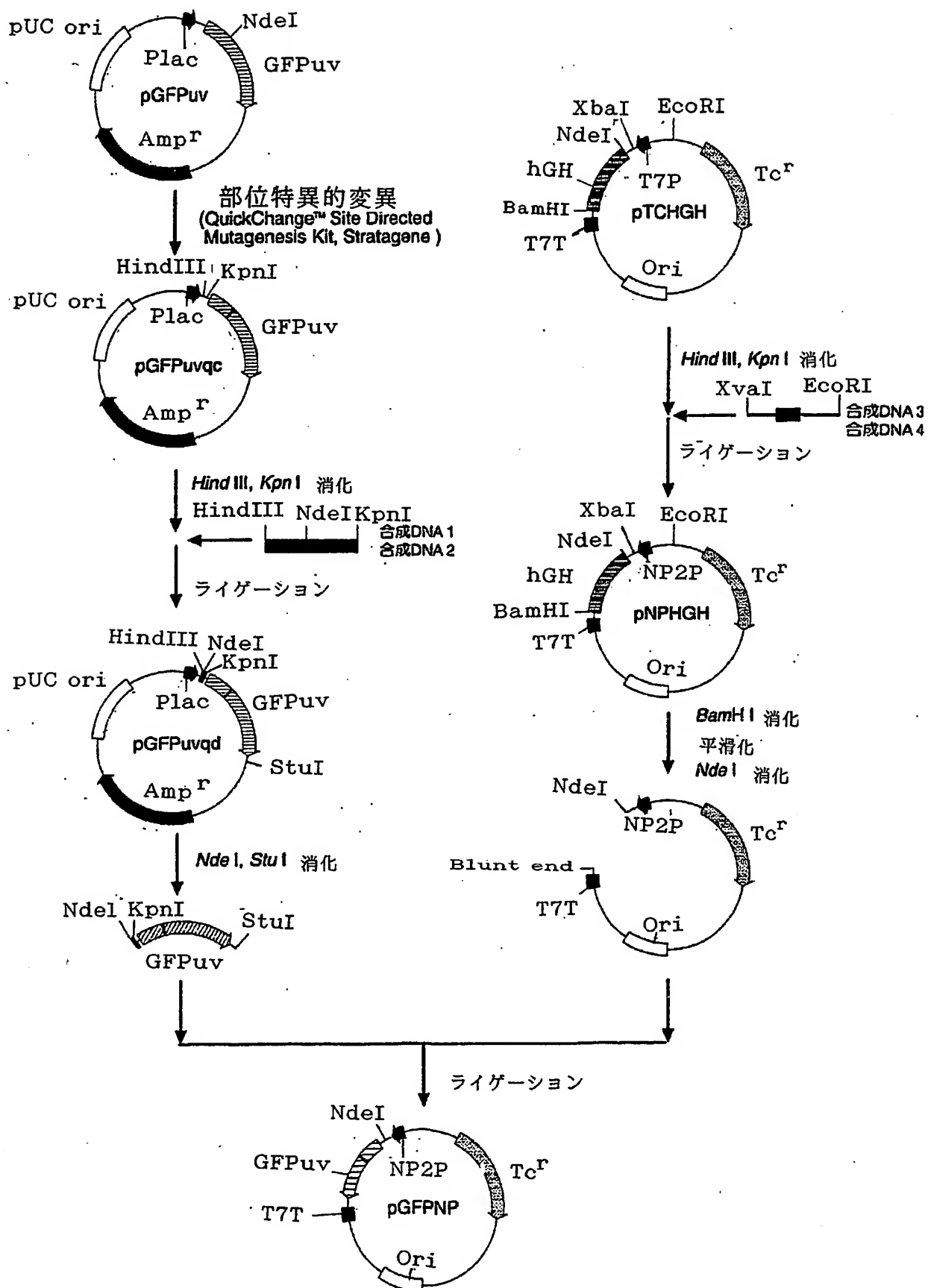
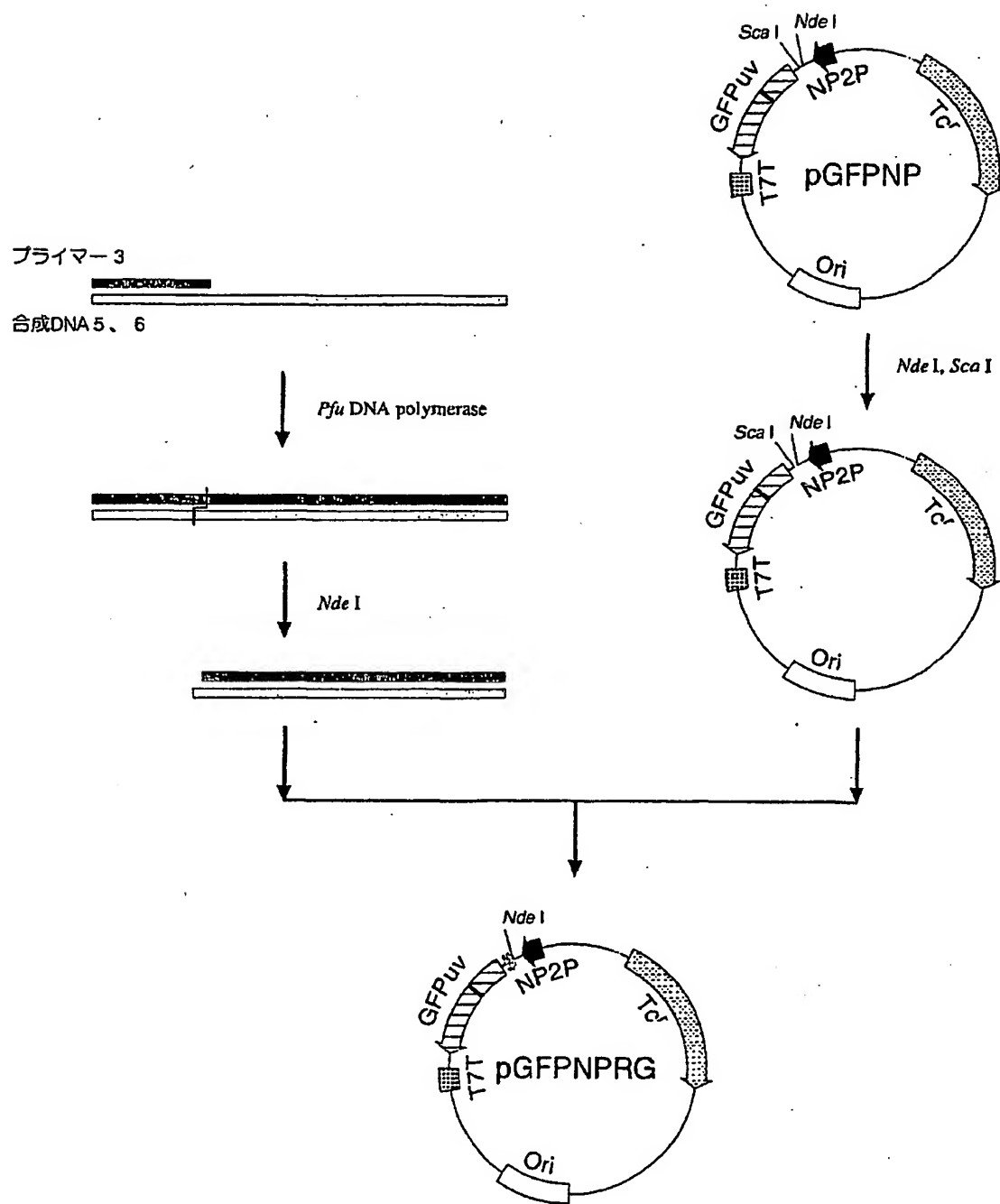
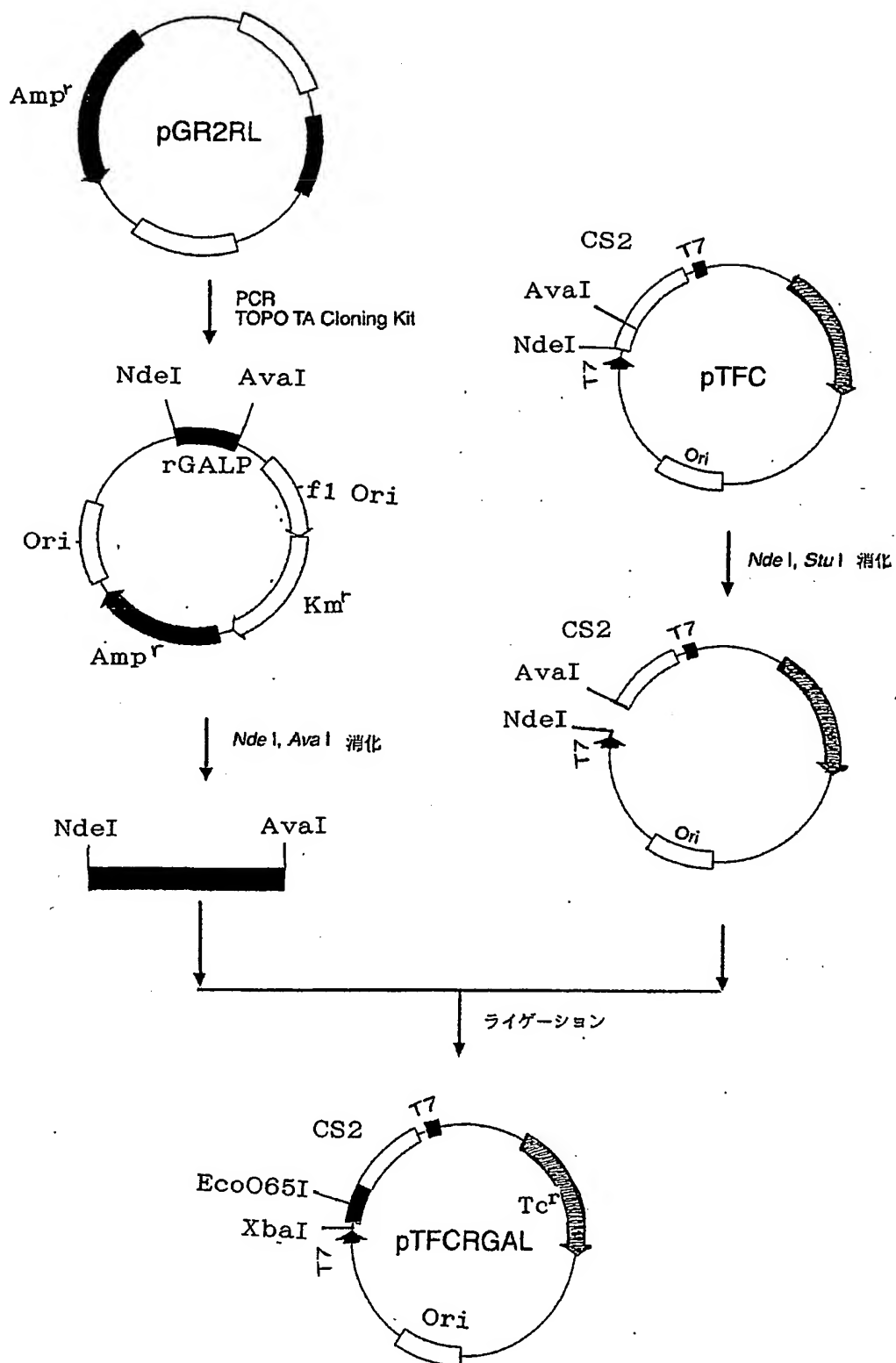


図 2



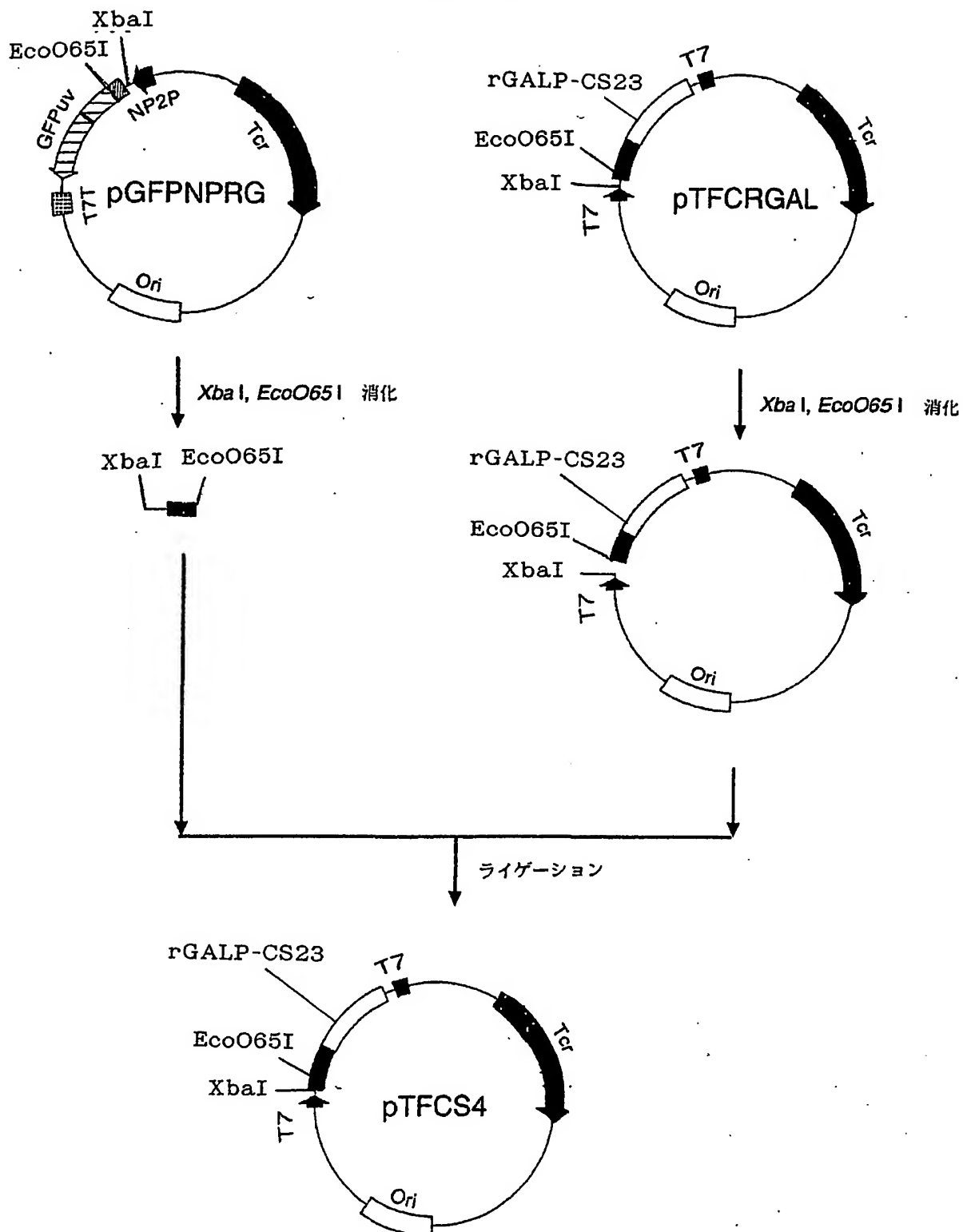
3/31

図 3



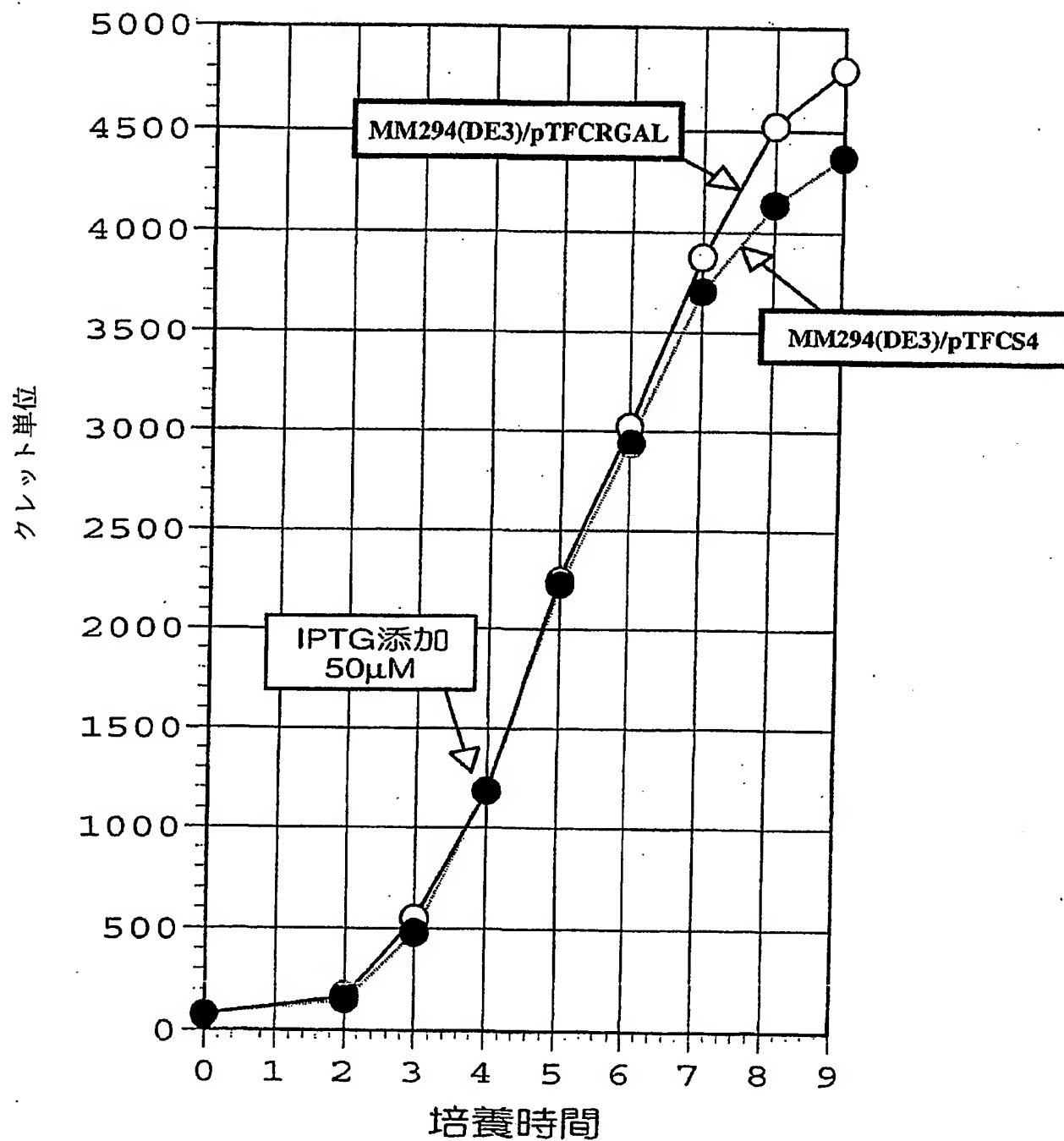
4/31

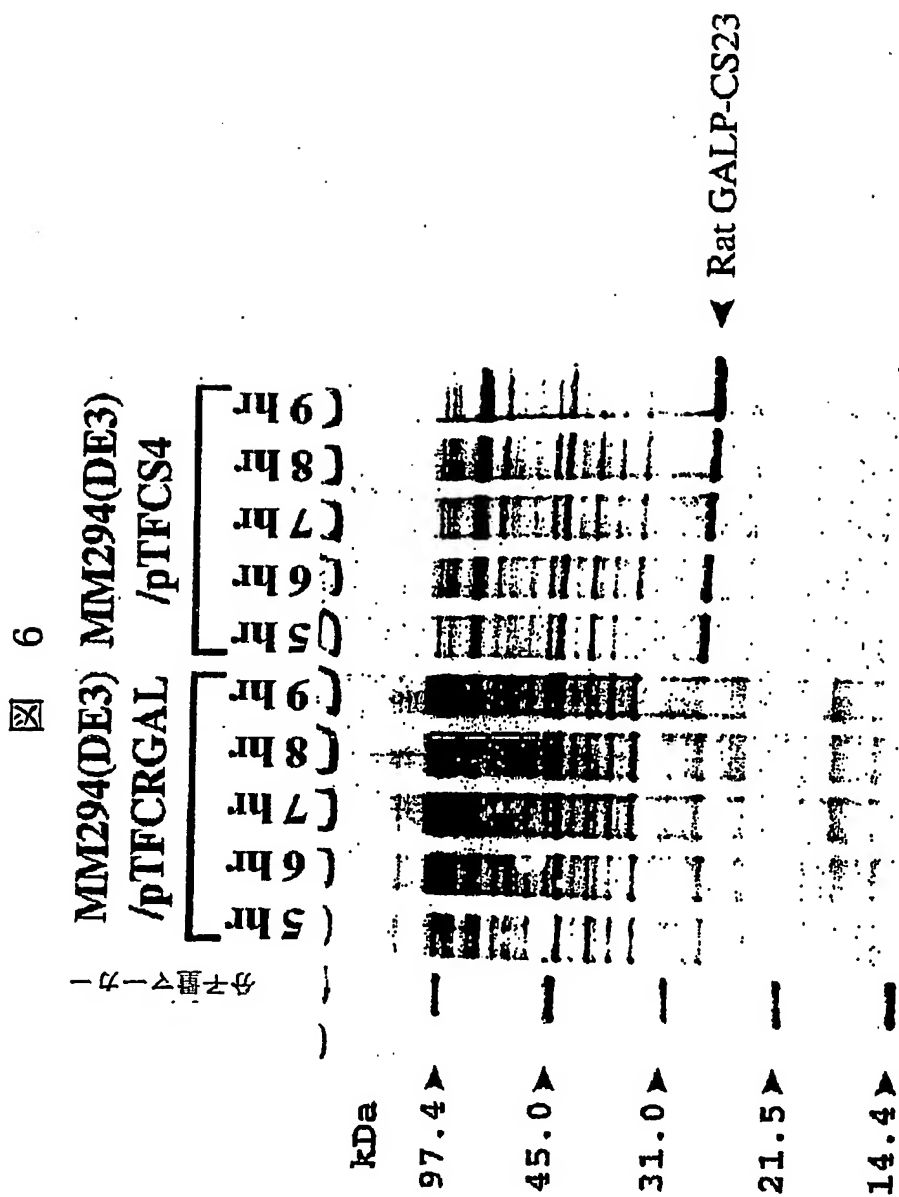
図 4



5/31

図 5





7/31

図 7

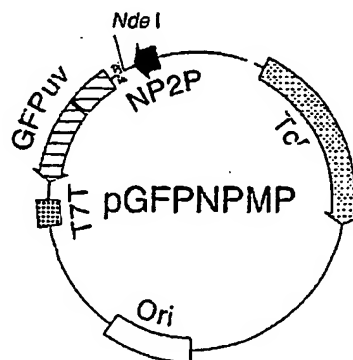
プライマー 8

合成DNA 7, 8

Pyrobex DNA polymerase

Nde I

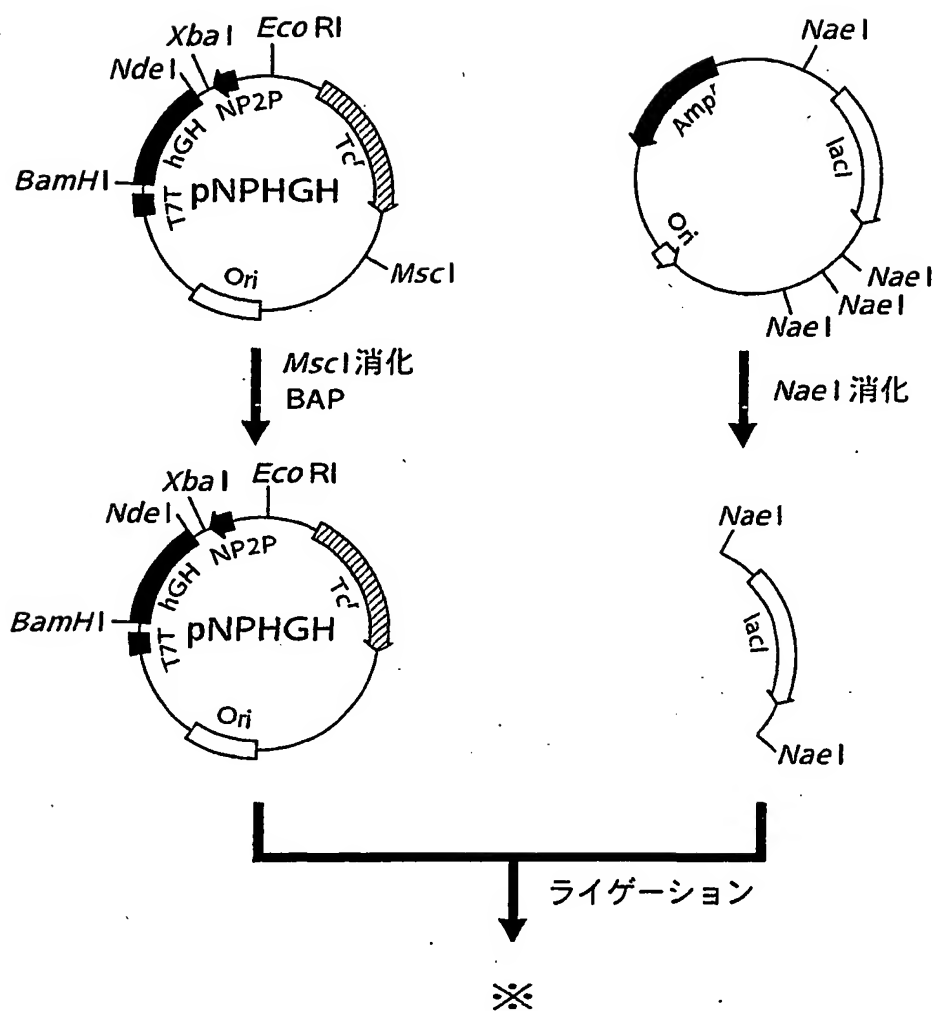
Nde I, Sca I





8 / 31

図 8



8/1/31

図 8

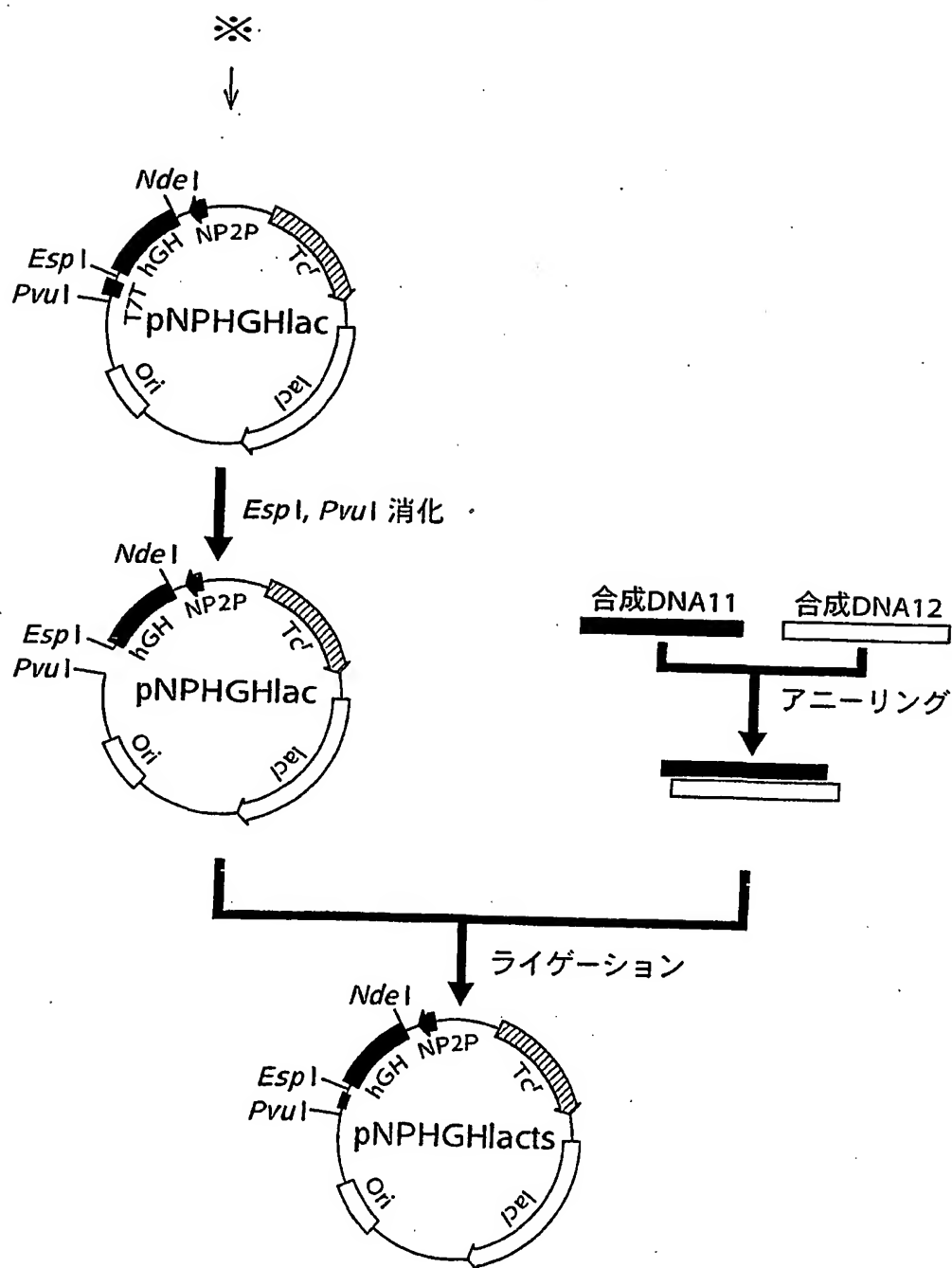
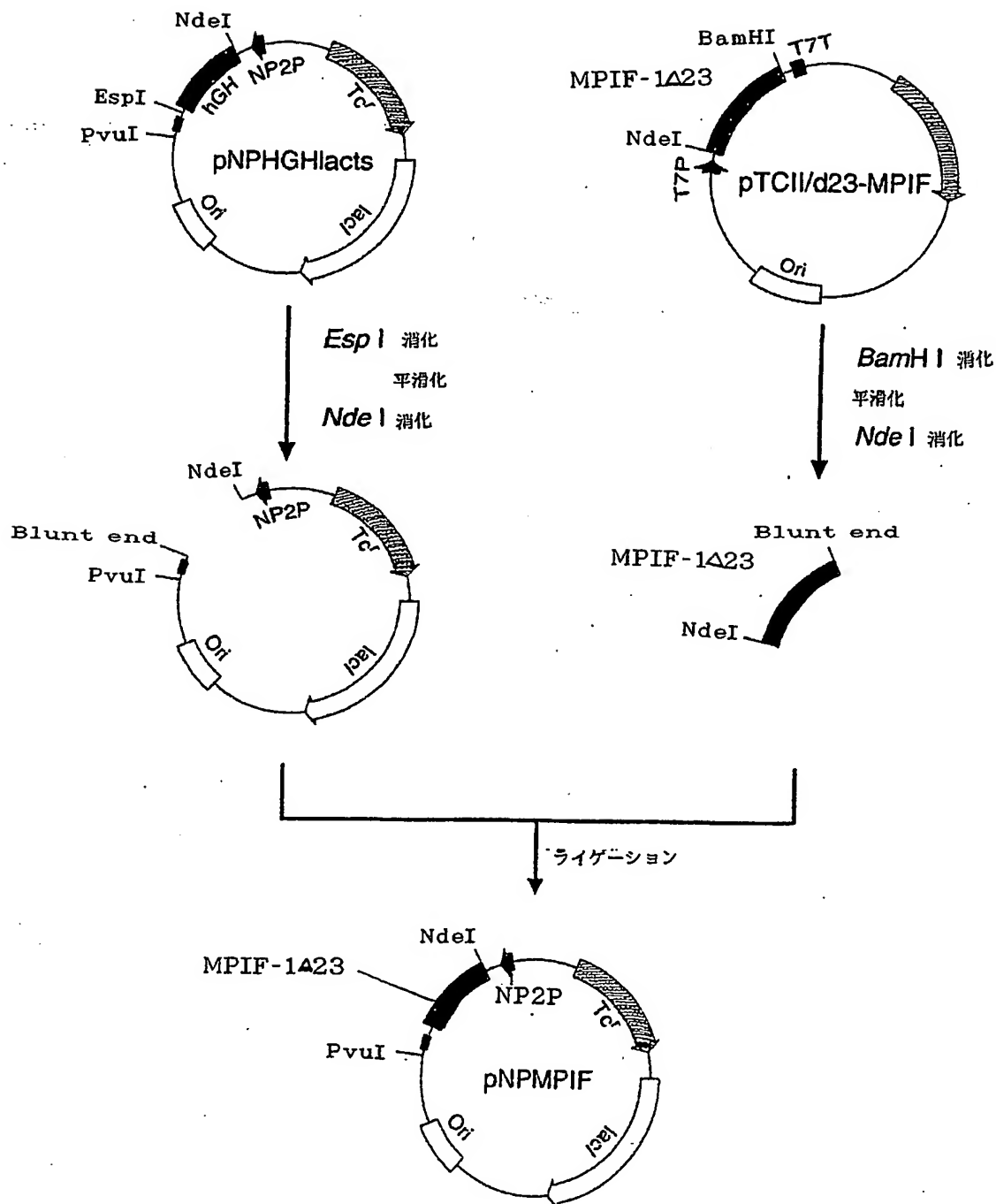
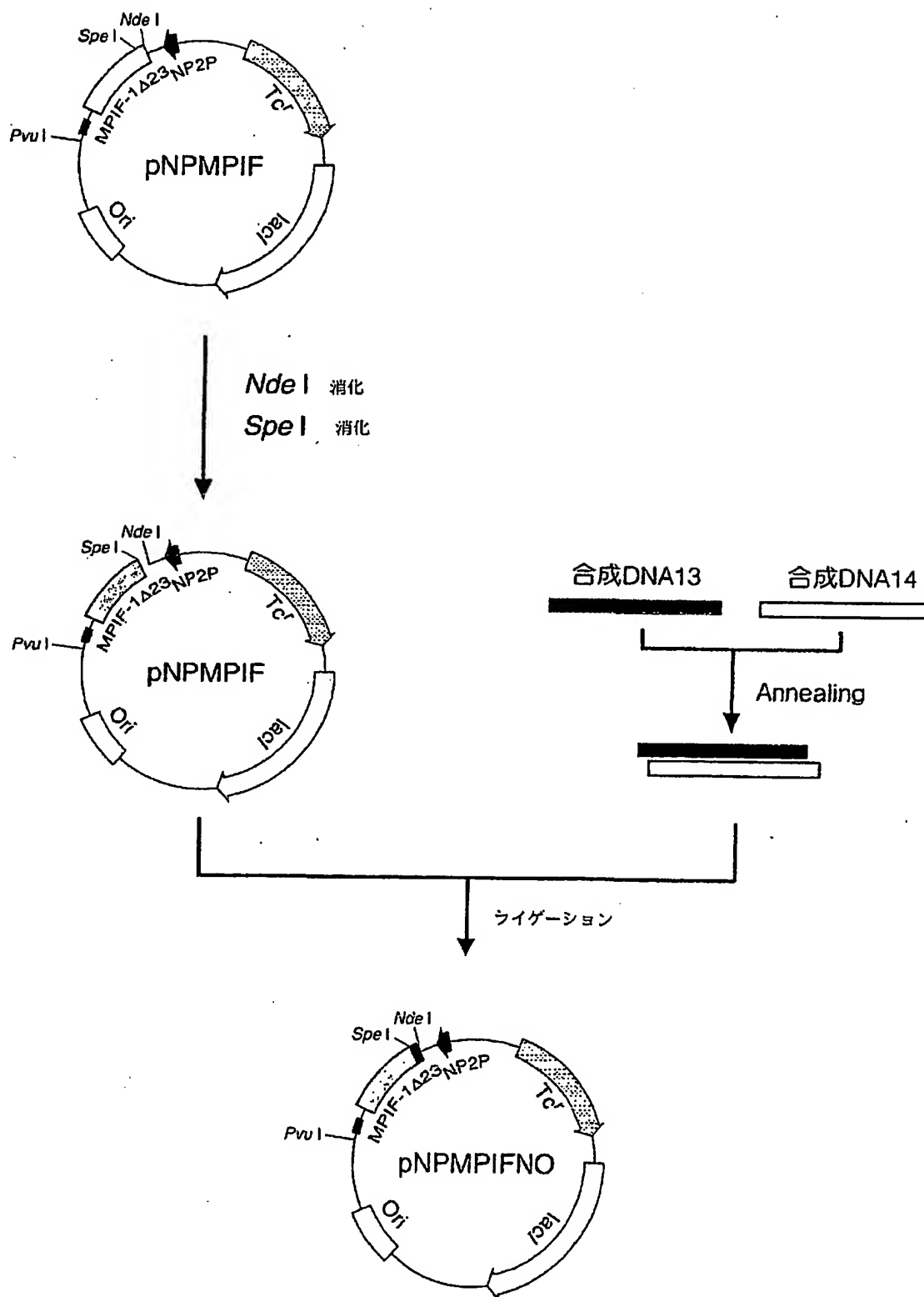


図 9



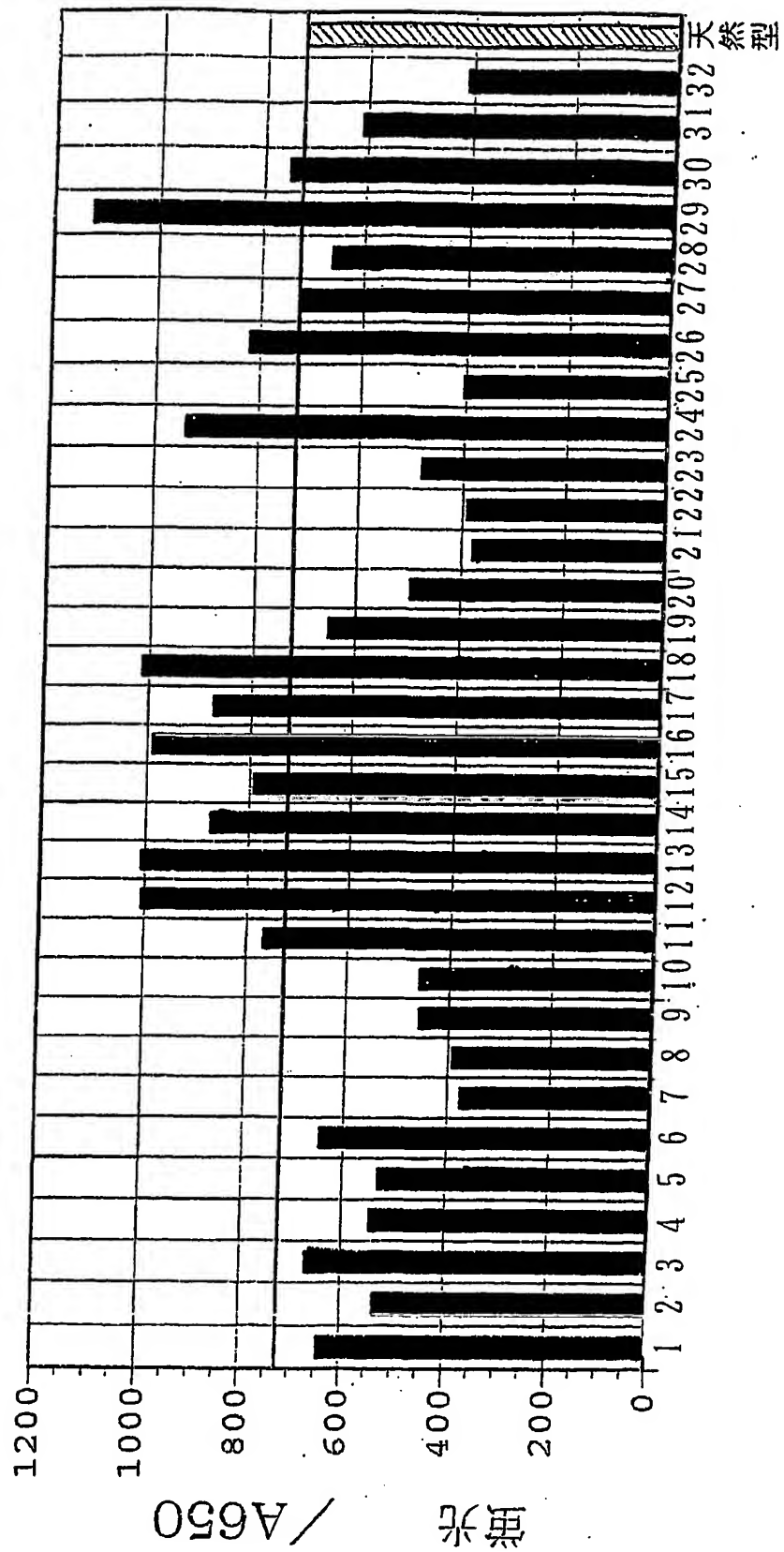
10/31.

図 10



11/31

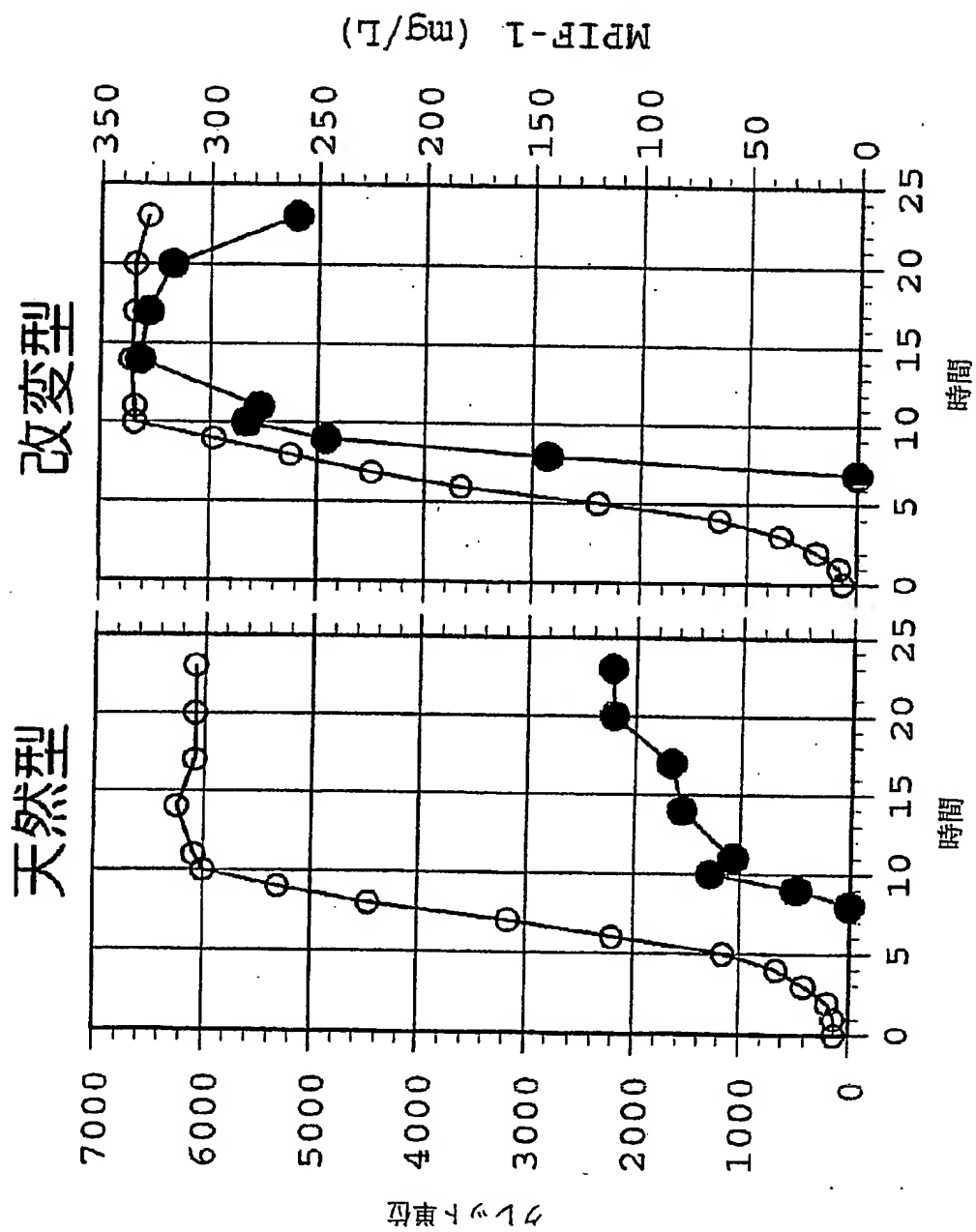
図 11



12/31

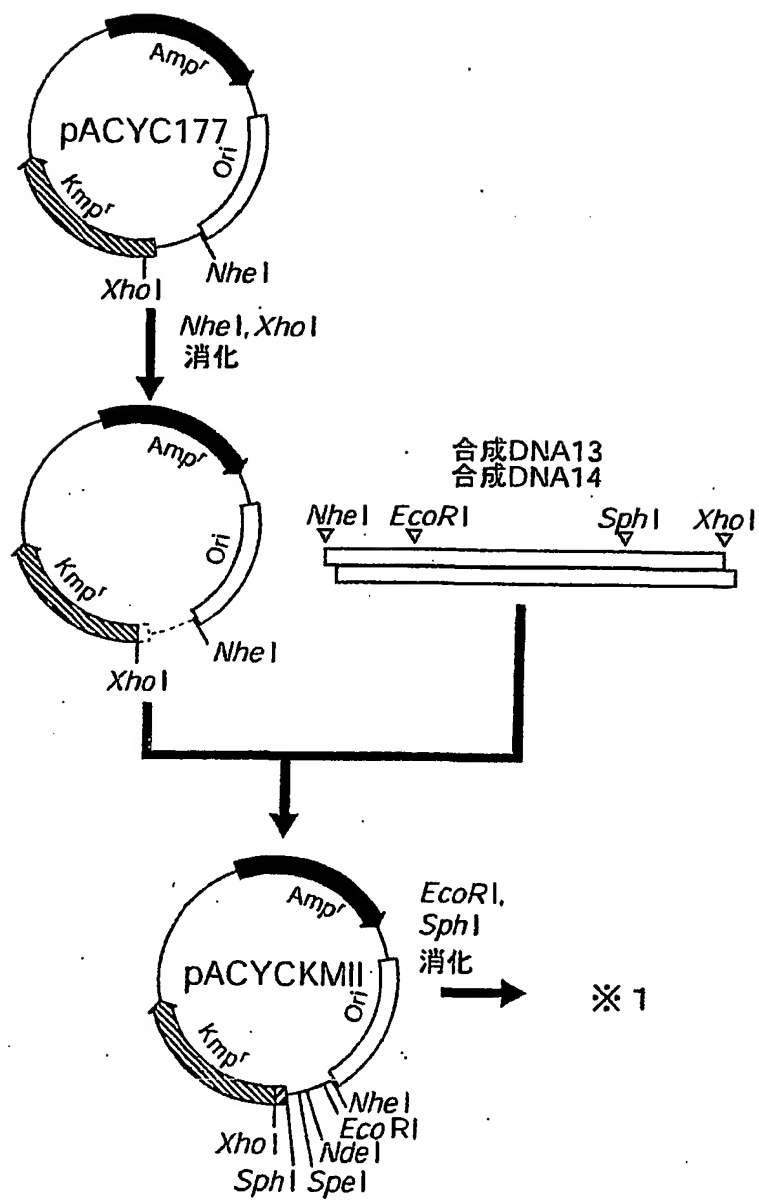
図 12

N末端塩基配列



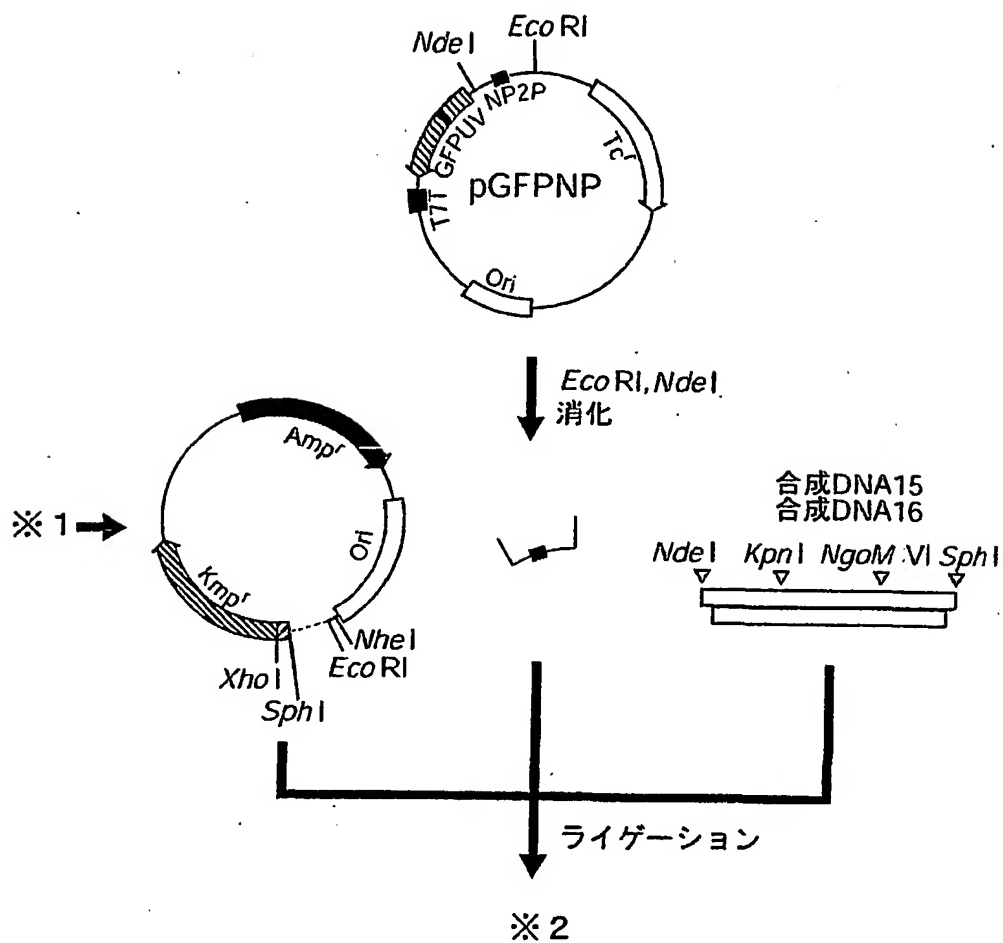
13/31

第13図



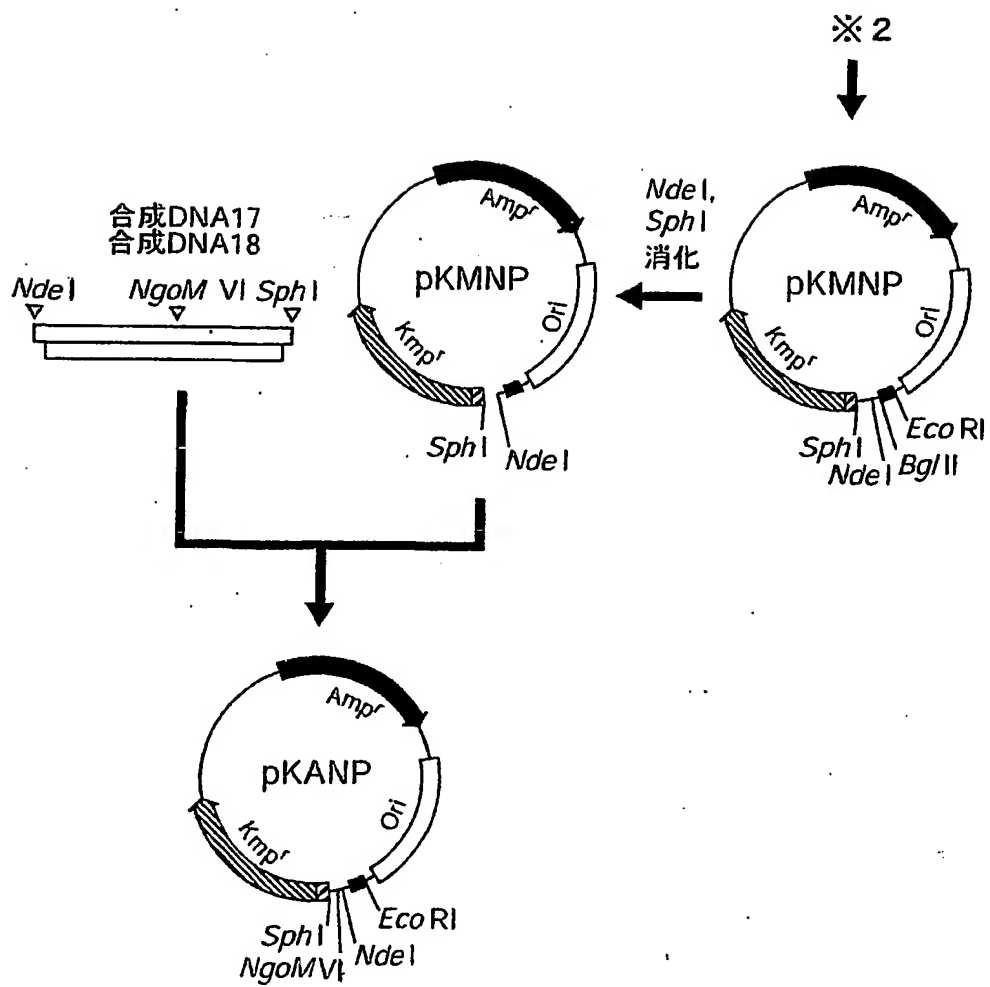
13 / 1 / 31

第13図



13/2/31

第13図



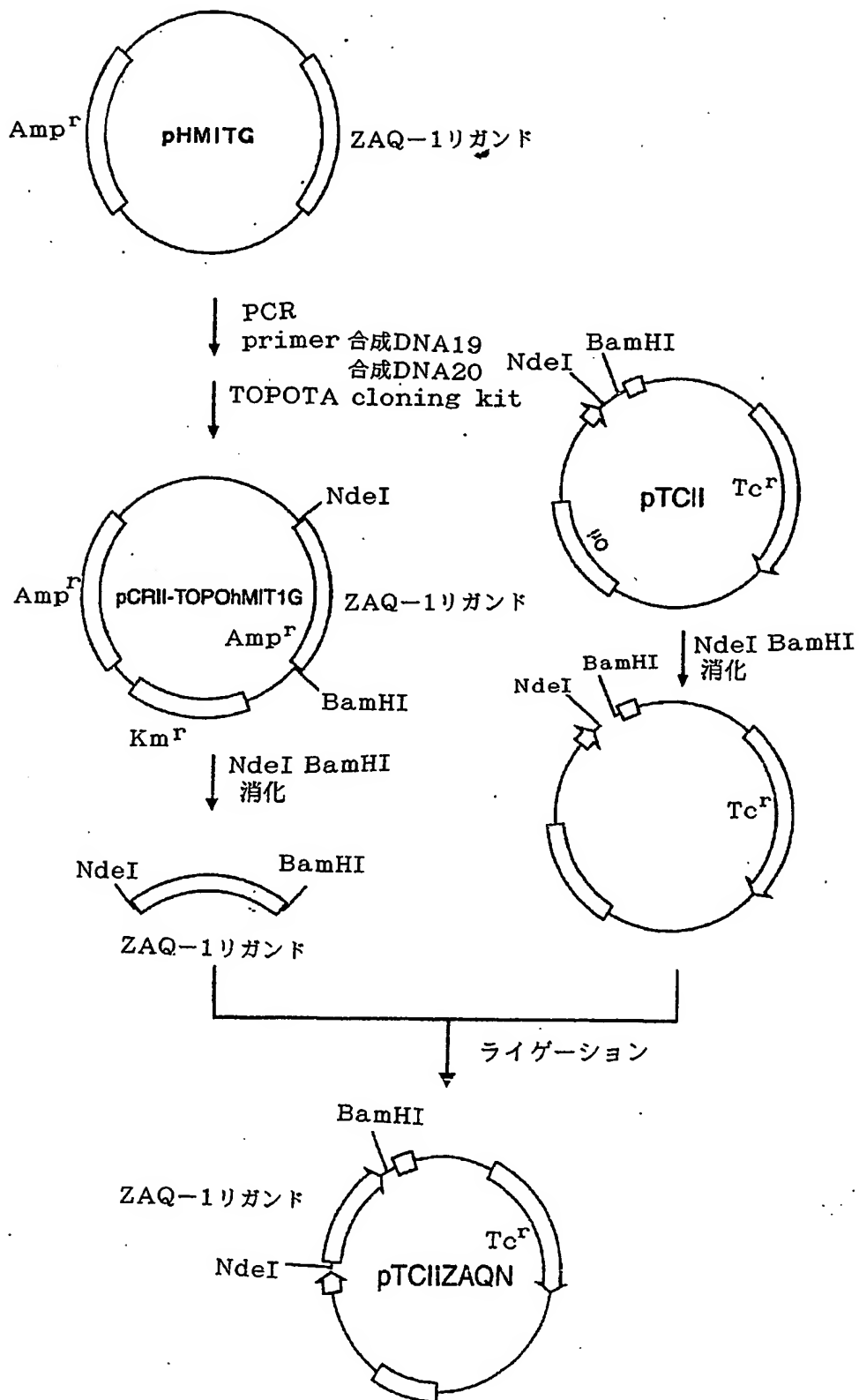
14/31

 14

	1	5	10	15	20															
アミノ酸	Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Cys	Glu	Arg	Asp	Val	Gln	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala
DNA	GCT	GTG	ATC	ACC	GGT	GCC	TGT	GAG	CGG	GAT	GTC	CAG	TGT	GGG	GCA	GGC	ACC	TGC	TGT	GCC
	21	25	30	35	40															
アミノ酸	Ile	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	Met	Cys	Thr	Pro	Leu	Gly	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu
DNA	ATC	AGC	CTG	TGG	CTT	CGA	GGG	CTG	CGG	ATG	TGC	ACC	CCG	CTG	GGG	CGG	GAA	GGC	GAG	GAG
	41	45	50	55	60															
アミノ酸	Cys	His	Pro	Gly	Ser	His	Lys	Val	Pro	Phe	Phe	Arg	Lys	Arg	Lys	His	His	Thr	Cys	Pro
DNA	TGC	CAC	CCC	GGC	AGC	CAC	AAG	GTC	CCC	TTC	TTC	AGG	AAA	CGC	AAG	CAC	CAC	ACC	TGT	CCT
	61	65	70	75	80															
アミノ酸	Cys	Leu	Pro	Asn	Leu	Leu	Cys	Ser	Arg	Phe	Pro	Asp	Gly	Arg	Tyr	Arg	Cys	Ser	Met	Asp
DNA	TGC	TTG	CCC	AAC	CTG	CTG	TGC	TCC	AGG	TTT	CCG	GAC	GGC	AGG	TAC	CGC	TGC	TCC	ATG	GAC
	81	85	86																	
アミノ酸	Leu	Lys	Asn	Ile	Asn	Phe														
DNA	TTG	AAG	AAC	ATC	AAT	TTT														

15/31

図 15



16/31

☒ 16

アミノ酸 1 5 10 15 20
 天然型 Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala
 コドン使用頻度 GCT GTG ATC ACC GGT GCC TGT GAG CGG GAT GTC CAG TGT GGG GCA GGC ACC TGC TGT GCC
 GCG GTG ATT ACC GGT GCG TGC GAA CGT GAT GTG CAG TGC GGT GCG GGT ACC TGC TGC GCG

アミノ酸 21 25 30 35 40
 天然型 Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu
 コドン使用頻度 ATC AGC CTG TGG CTT CGA GGG CTG CGG ATG TGC ACC CCG CTG GGG CGG GAA GGC GAG
 ATT AGC CTG TGG CTG CGT GGT CTG ATG TGC ACC CCG CTG GGT CGT GAA GGT GAA GAA

アミノ酸 41 45 50 55 60
 天然型 Cys His Pro Gly Ser His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His Thr Cys Pro
 コドン使用頻度 TGC CAC CCC GGC AGC CAC AAG GTC CCC TTC TTC AGG AAA CGC AAG CAC CAC ACC TGT CCT
 TGC CAT CCG GGT AGC CAT AAA GTG CCG TTC TTC CGT AAA CGT AAA CAT CAT ACC TGC CCG

アミノ酸 61 65 70 75 80
 天然型 Cys Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
 コドン使用頻度 TGC TTG CCC AAC CTG CTG TGC TCC AGG TTC CCG GAC GGC AGG TAC CGC TGC TCC ATG GAC
 TGC CTG CCG AAC CTG CTG TGC TGC AGC CGT TTC CCG GAT GGT CGT TAT CGT TGC AGC ATG GAT

アミノ酸 81 85 86
 天然型 Leu Lys Asn Ile Asn Phe
 コドン使用頻度 TTG AAG AAC ATC AAT TTT
 CTG AAA AAC ATT AAC TTT

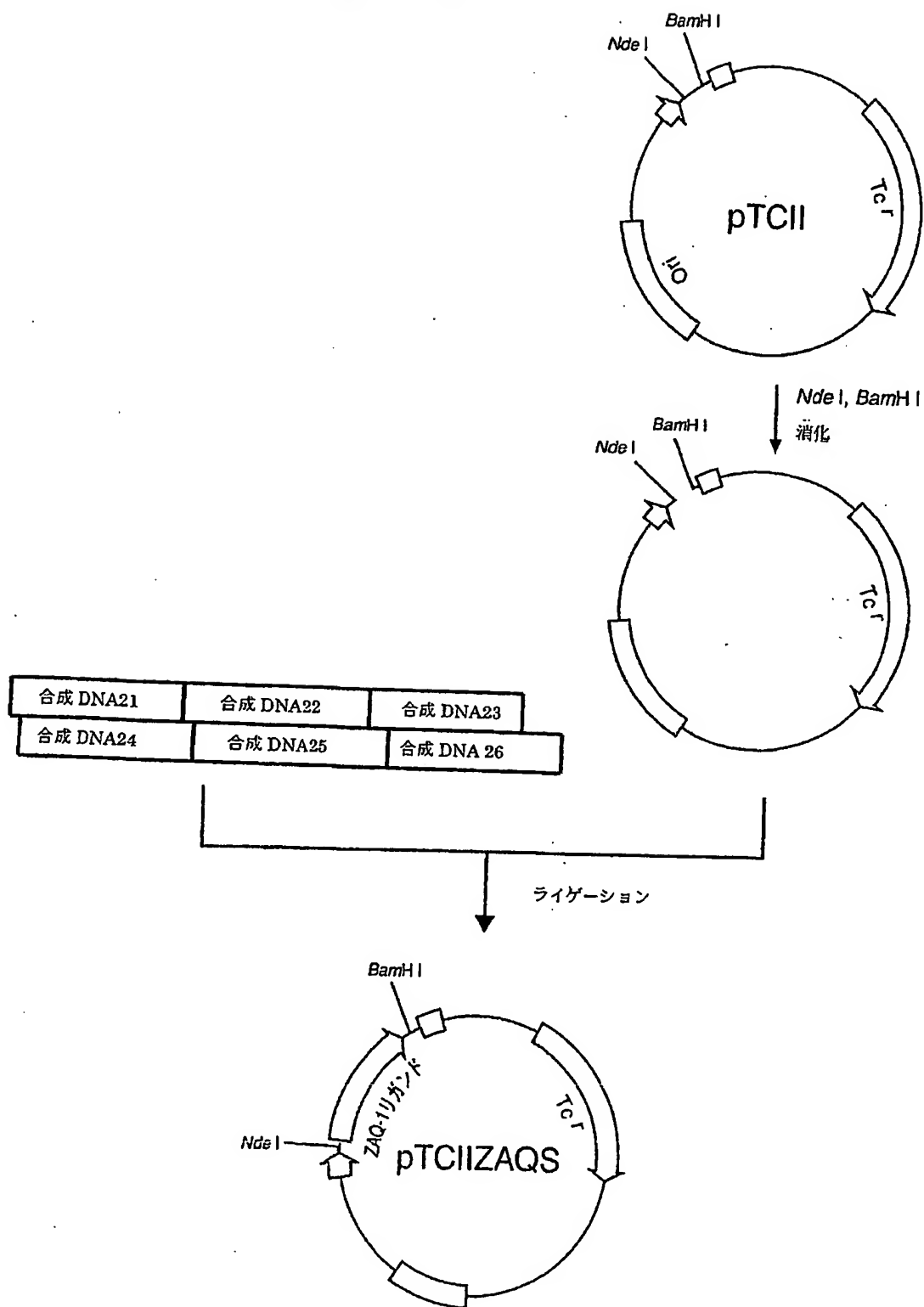
17 / 31

17

L1 (88mer): 5'-TATGGCGGTGATTACCGGTGCGTGGCGAAGTGAATGTCAGTGGGTGGGGTACCTCTGCGCGGATTAGCCGTGGCTCGGTGGTCTG
L2 (92mer): 5'-CGTATGTGCACCCCGCTGGTCTGTGAAGGTGAGATGCCATCCGGTAGCCATAAGTCCGTTCTTCGGTAACGTAACATCATACCTG
L3 (86mer): 5'-CCCGTCCCTGCGGAACCTGCTGTGGAGCCGTTCCCGATGGTCGTTATCGTTGCAGCATGGATCTGATAAACAATTACTTTTAGG
L4 (94mer): 5'-CACATACGCAGACCCAGGAGCCACAGGCTATGCGCCAGCAGGTACCGGACGCACTGACATCAGTTCCGACGCCACCGGTATATCACCGCA
L5 (93mer): 5'-AGGCACGGGACGTATGATGTTTACGTTACGGAAGACGGCACCTTATGGCTACCCGATGGCATTTCTTCACTTCAGACCCAGCGGGTG
L6 (81mer): 5'-GATCCCTAAAGTTATGTTTTCAGATCCATGCTGCACGATACGACCATCCGGGAAACGGCTGCACAGCAGTTCCGGC

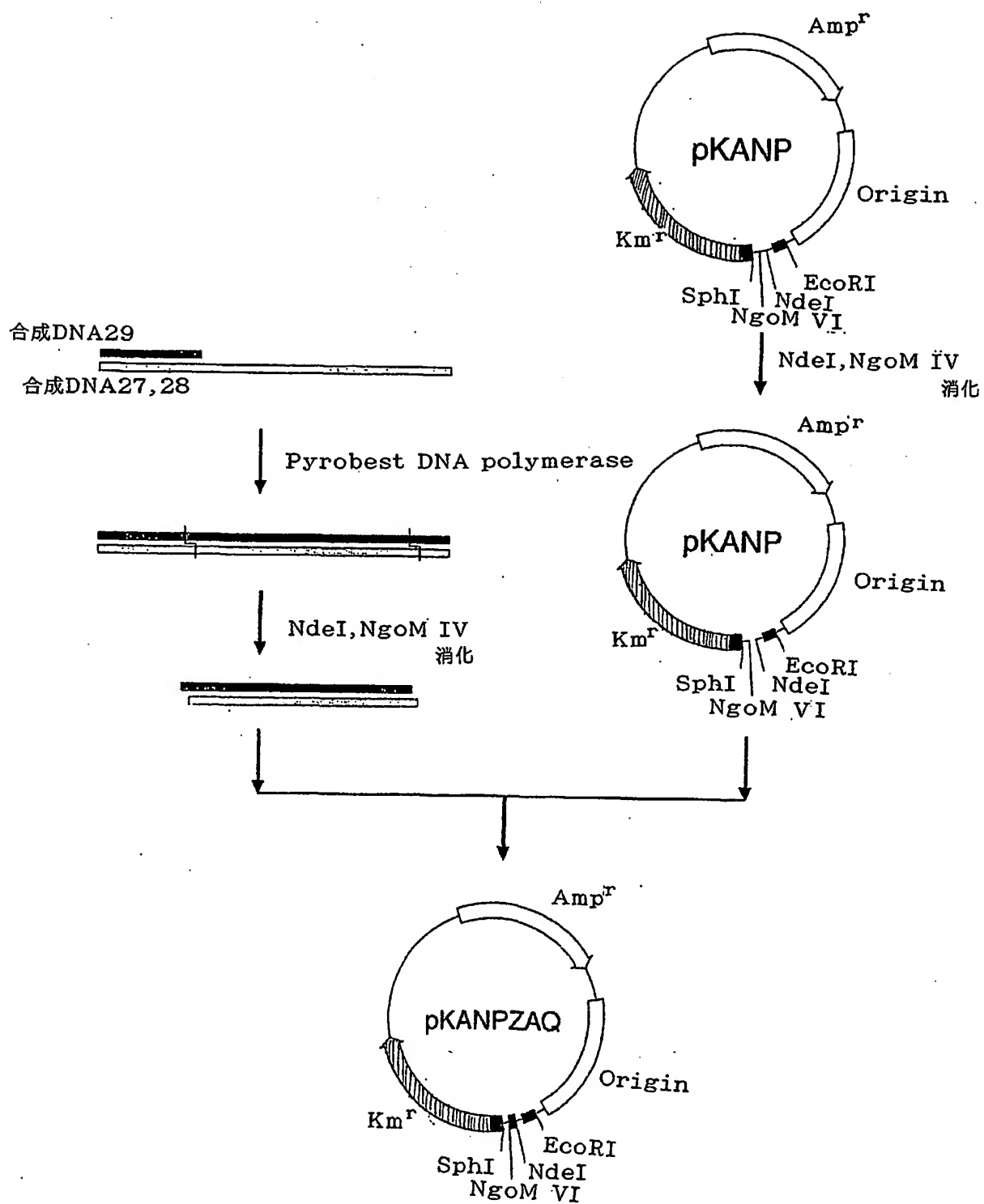
18 / 31

図 18



19/31

図 19



20/31

図 20

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
天然型	Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Cys	Glu	Arg	Asp
コドン	GCT	GTG	ATC	ACC	GGT	GCC	TGT	GAG	CGG	GAT
N-至適化	GCG	GTG	ATT	ACC	GGT	GCG	TGC	GAA	CGT	GAT
	GCG	GTC	ATC	ACT	GGC	GCA	TGC	GAA	CGC	GAC

天然型 : 天然型配列
 コドン : 使用頻度の高いコドンを用いた配列
 N-至適化 : 実施例 1 3 で得られた至適化配列

図 21

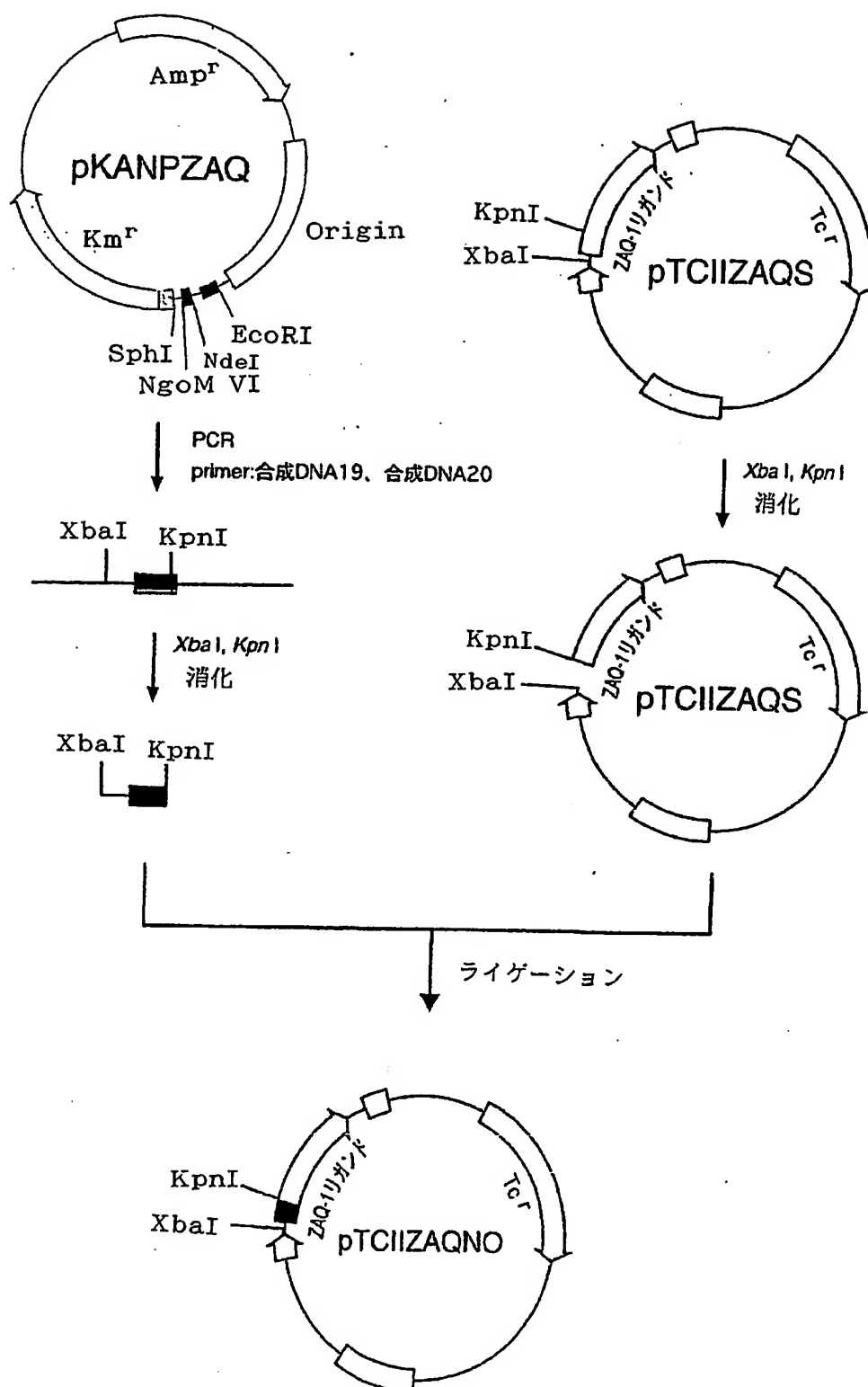
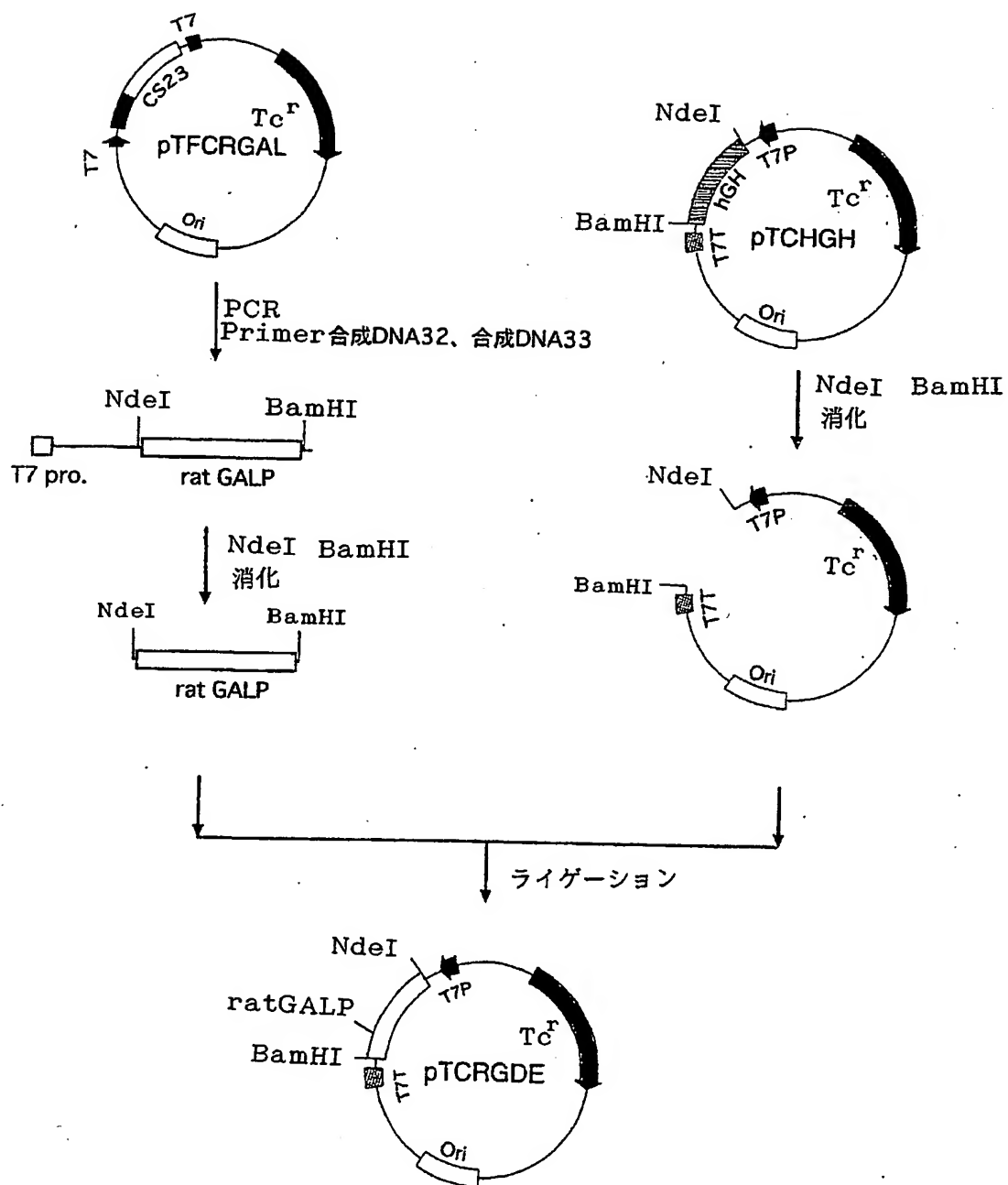
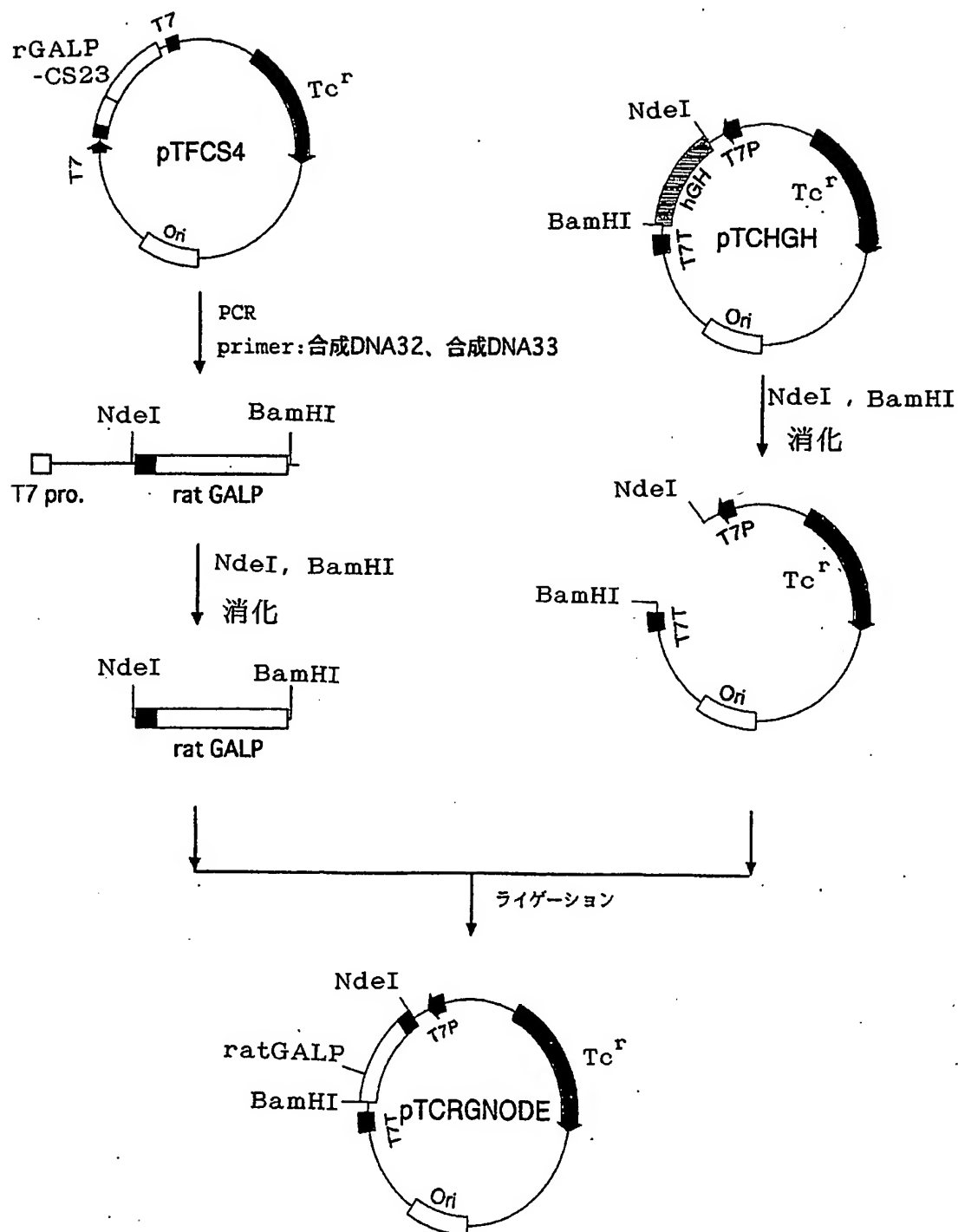


図 23



24/31

図 24



25/31

☒ 25

天然型
至適化

1 Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Thr Gly Gly Thr Trp Thr Leu Asn Ser Ala 15
GCA CCT GCT CAC CAC AGG GGA CGA GGA GGC TGG ACC CTC AAT AGT GCT 45
GCT CCA GCG CAT CGT GGT GGG CGT GGT GGT TTA AAT AGT GCT

天然型
至適化

16 Gly Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Leu Ser Ser Lys Ala Asn 30
GGT TAC CTC CTC CTG GGT CCT GTC CTC CAC CTT TCC TCA AAG GCC AAC 90
GGA TAC TTG TTA GGT CCA GTG TTA CAT TTA AGC AGC AAA GCA AAC

天然型
至適化

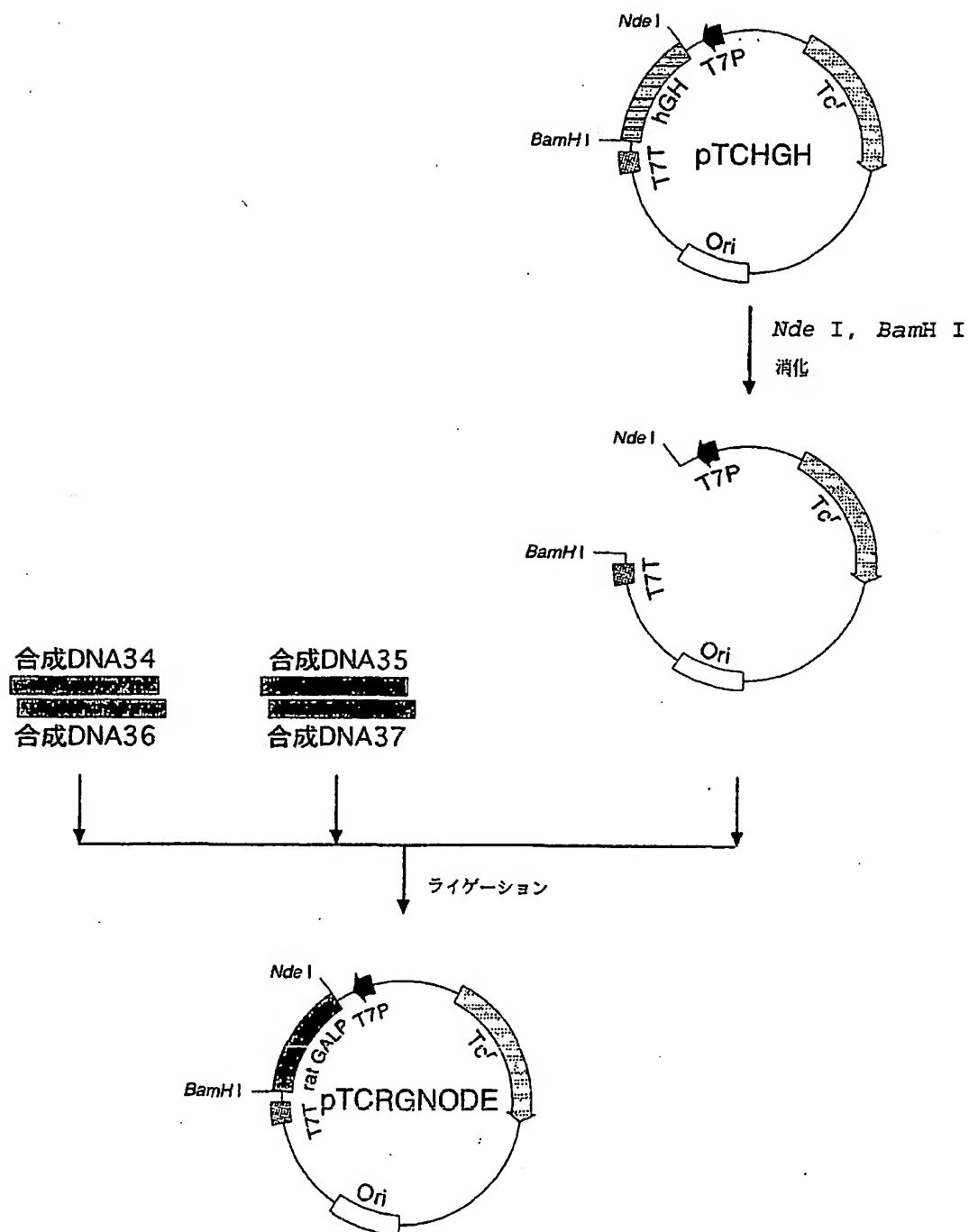
31 Gln Gly Arg Lys Thr Asp Ser Ala Leu Glu Ile Leu Asp Leu Trp 45
CAG GGC AGG AAG ACA GAC TCA GCT CTT GAG ATC CTA GAC CTG TGG 135
CAG GGC AGG AAG ACA GAC TCA GCT CTT GAG ATC CTA GAT CTG TGG

天然型
至適化

46 Lys Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Ser Arg Ser Pro Arg Met Thr 60
AAG GCC ATA GAT GGG CTC CCT TAT TCC CGC TCT CCA AGG ATG ACC 180
AAG GCC ATA GAT GGG CTT CCT TAT TCT CGG TCT CCC CGC ATG ACG

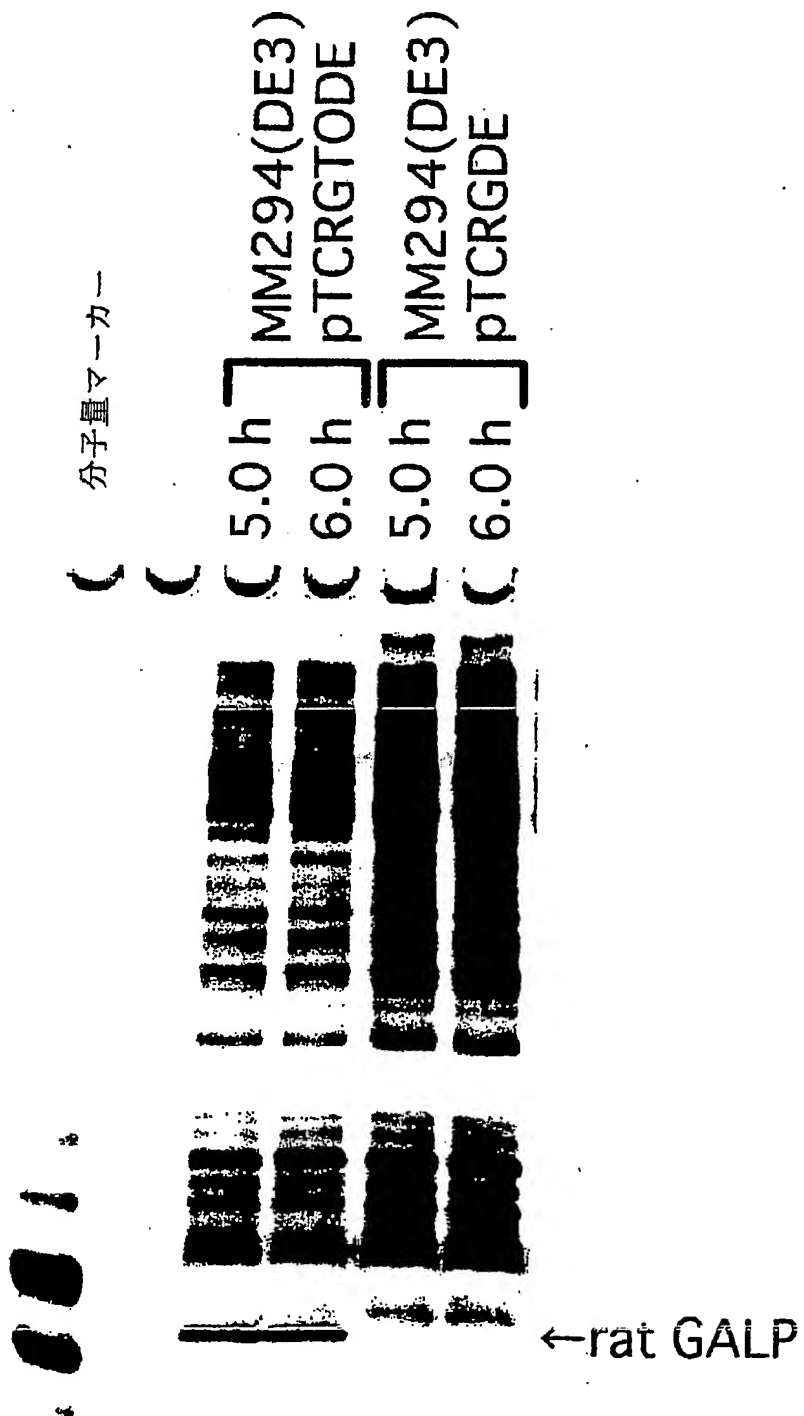
26 / 31

図 26



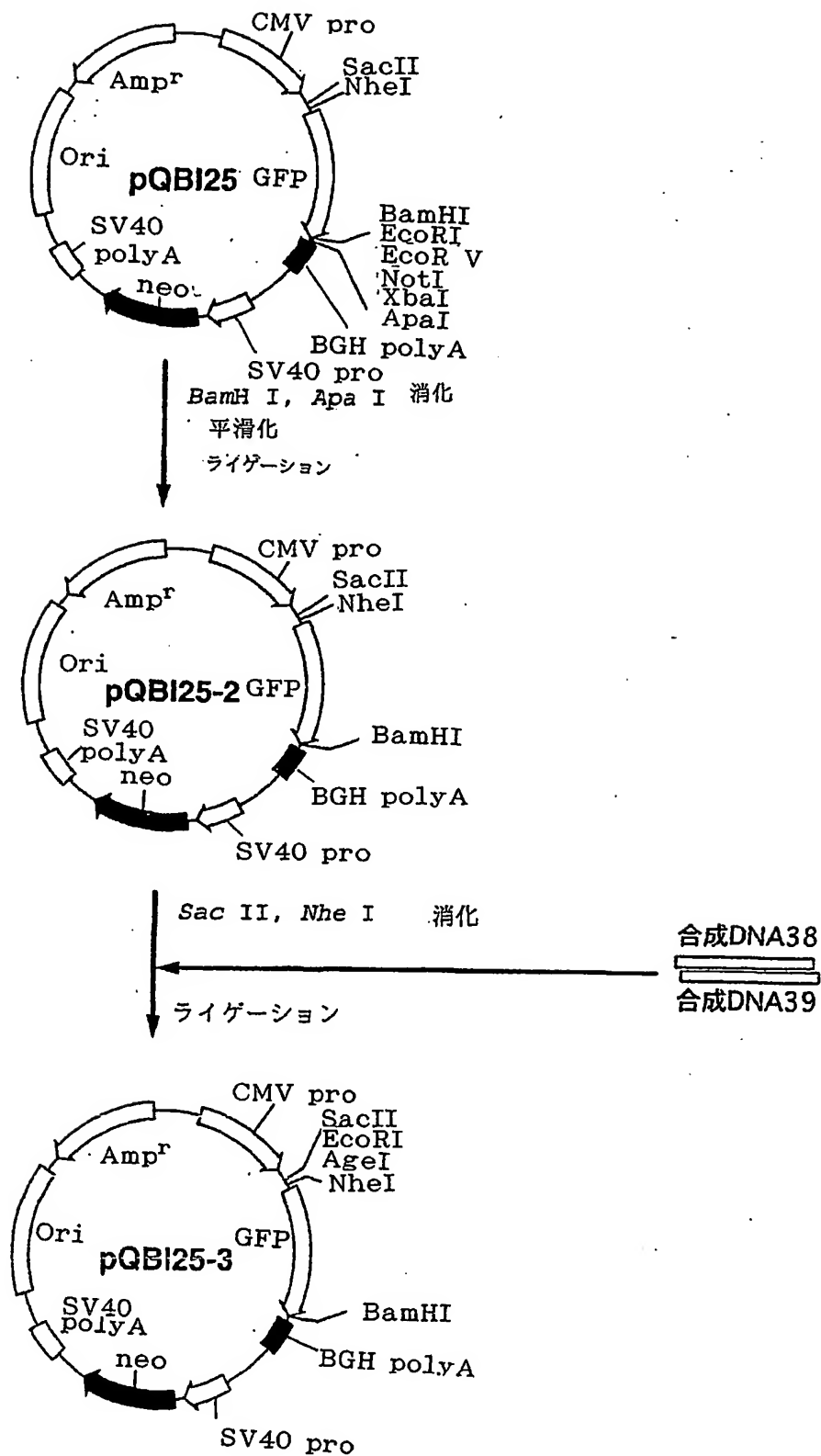
27/31

図 27



28/31

図 28

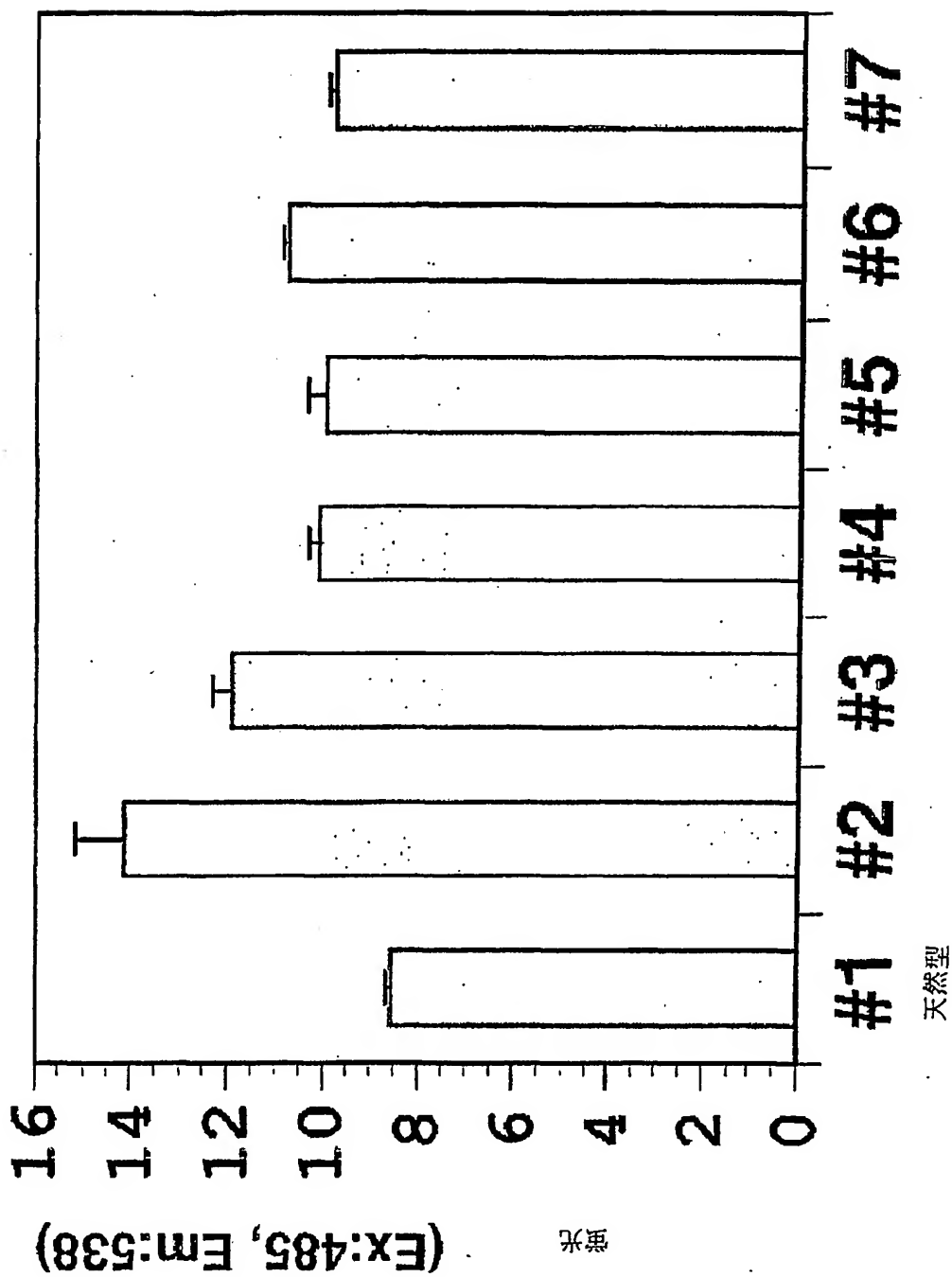


29

	Met	Gly	Leu	His	Leu	Arg	Pro	Tyr	Arg	Val	Gly	Leu	Leu	Pro
	#1	ATG	GGC	CTC	CAC	CTC	CGC	CCC	TAC	CGT	GTG	GGG	CTG	CTC
	#2	ATG	GGC	CTG	CAC	CTG	CGG	CCC	TAC	CGG	GTG	GGC	CTG	CTG
	#3	ATG	GGA	CTT	CAC	CTT	AGA	CCT	TAC	AGA	GTG	GGA	CTT	CTT
	#4	ATG	GGT	CTA	CAT	CTA	CGT	CCG	TAT	CGT	GTA	GGT	CTA	CTA
	#5	ATG	GGG	CTA	CAT	CTA	CGC	CCG	TAT	CGC	GTA	GGG	CTA	CTA
	#6	ATG	GGT	CTA	CAT	CTT	AGA	CCC	TAT	CGT	GTA	GGA	CTG	CTT
	#7	ATG	GGT	CTA	CAT	CTT	AGA	CCC	TAC	CGA	GTT	GGA	TTG	CTT
														CCG

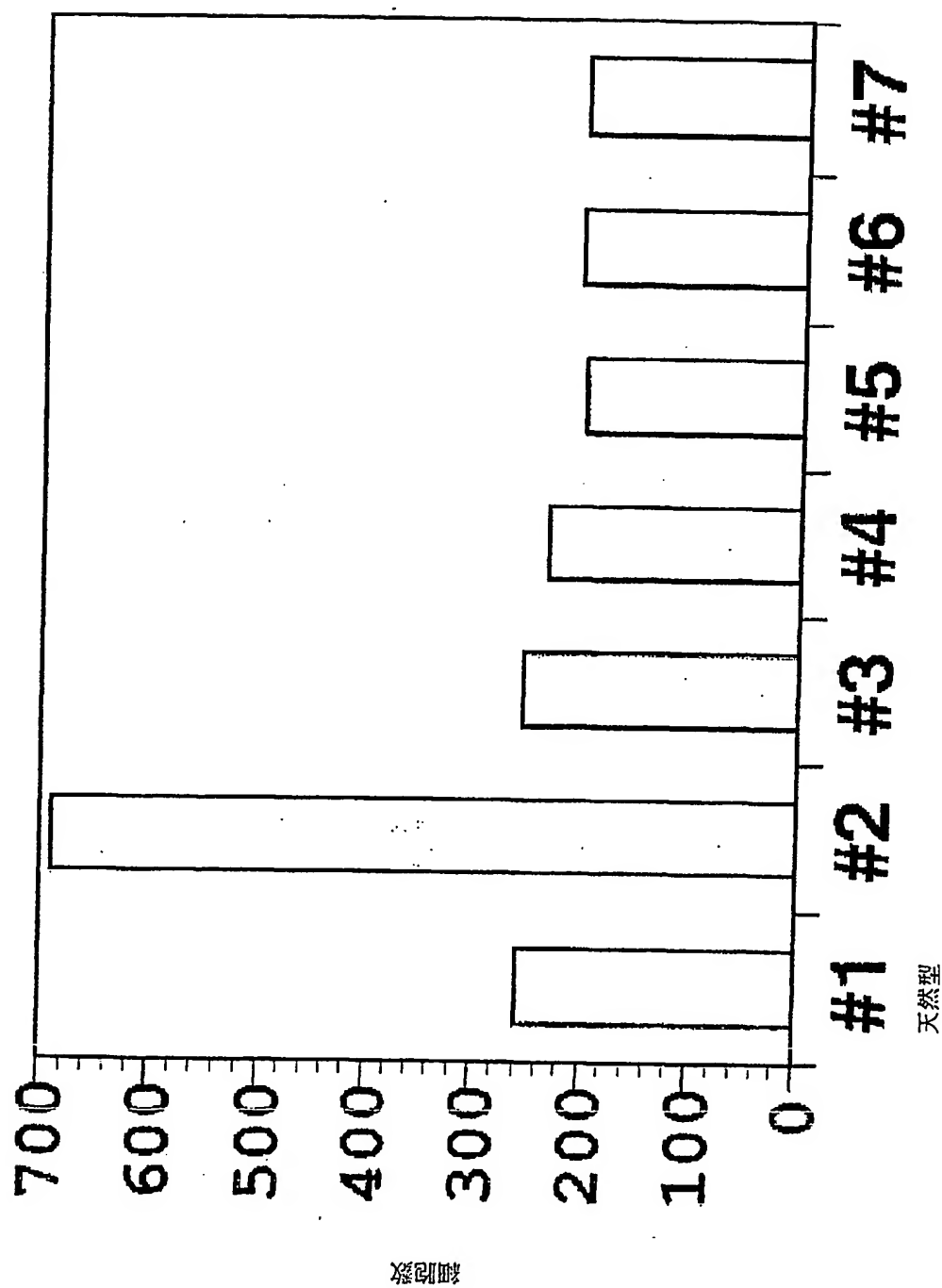
29/31

図 30



31 / 31

図 31



[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Method for production of recombinant protein

<130> P2001-141PCT

<150> JP 2000-229064

<151> 2000-07-25

<160> 122

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

cgttatccgg atcacatgaa acggcatg 28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

catgccgttt catgtgatcc ggataacg 28

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

agcttcatal gttcgaagta ctagatctgg tac 33

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

cagatctagt acttcgaaca tatga 25

<210> 5

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

aattctataa aaataattgt tgacatatTT tataaatTTT ggcataatag atctaattgt 60
gagcggataa caattctgca gaagcttgag ctcggtaccc ggggacCt 109

<210> 6

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

ctagaggatc cccgggtacc gagtcaagc ttctgcagaa ttgttatccg ctcacaatta 60
gatctattat gccaaaattt ataaaatatg tcaacaatta tttttatag 109

<210> 7

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

aggtaccag cactatttaa agtccanccn ccncgncnc grtgngcngg ngccatatgt 60
atatctcctt cttaaag 77

<210> 8

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

aggtaccag cactatttaa agtccanccn ccycincyc trtgngcngg ngccatatgt 60
atatctcctt cttaaag 77

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

ctttaagaag gagatataca tatg 24

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

ttcatacacg gtgcctgact gcgttag 27

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

tcaacaagaa ttgggacaac tcc 23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

agcatatggc acctgctcac agg 23

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

ccctcggggc aggtcatcct tggagag 27

<210> 14

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

gggatgcttc gtgggtgta ggagatgcag cagtcagcac tagtngcrtg raaycrtcc 60
atatgttggc ggcctt 77

<210> 15

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

gggatgcttc gtgggtgta ggagatgcag cagtcagcac tagtngcrtg raancgrtcc 60
atatgttggc ggcctt 77

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

AAGGCGCGCC AACATATG 18

<210> 17

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

tgagcatgca tactagtctc gagtaatccc acagccgccg ccagttccgc tggcggcggc 60
attttcgat 69

<210> 18

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

cgaaaatgcc gccgccagcg gaactggcgg cggctgtggg attactcgag actagtatgc 60
atgc 64

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

tatggatcga tttcacgcaa 20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

ctagttgcgt gaaatcgatc ca 22

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser 14

<210> 22

<211> 42

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

gcacctgctc acaggggacg aggaggctgg accctcaata gt 42

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

gctccagcgc atcgtgggcg tggtaggttg actttaata gt 42

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

gcacctgcac atcgtgggcg aggaggctgg actttaata gt 42

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

gcaccacacg cacgcggacg aggggatgg actttaata gt 42

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

gcaccagcac acagaggaag gggcgatgg actttaata gt 42

<210> 27

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

gcaccagctc accgaggccg aggaggctgg actttaata gt 42

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

gcacccgctc accgcggacg tggaggctgg actttaata gt 42

<210> 29

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

gcaccagcac atagaggaag aggaggctgg acttttaaata gt 42

<210> 30

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

gcaccggcac accgcggacg agggggttgg acttttaaata gt 42

<210> 31

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 31

gcaccggcgc accgcggacg tggcagatgg acttttaaata gt 42

<210> 32

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

gccccagcac atcgcgacg tggcggatgg actttaata gt 42

<210> 33

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

gccccagcac accgcggtcg cggcggatgg actttaata gt 42

<210> 34

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

gctccagcac accgggggcg ggggggatgg actttaata gt 42

<210> 35

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 35

gcaccggcac accgcggccg cggaggatgg actttaata gt 42

<210> 36

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

gcgccagctc atcggggtcg tggcgggtgg actttaata gt 42

<210> 37

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 37

gctccagctc atcgaggacg cggcggttgg actttaata gt 42

<210> 38

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 38

gcgccagcac accgtggccg aggcggctgg actttaata gt 42

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 39

gcaccggcgc accgcggacg tggcagatgg actttaata gt 42

<210> 40

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 40

gccccagcgc atcgggggcg tggcggctgg actttaata gt 42

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Human

<400> 41

Asp Arg Phe His Ala 5

<210> 42

<211> 15

<212> DNA

<213> Human

<400> 42

gacagattcc acgct 15

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 43

gacagattcc acgca 15

<210> 44

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 44

gacagattcc acgcc 15

<210> 45

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 45

gacagattcc atgca 15

<210> 46
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 46
gacagatttc acgca 15

<210> 47
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 47
gacagatttc acgcc 15

<210> 48
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 48
gacagatttc acgcg 15

<210> 49
<211> 15
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 49

gacaggttcc acgca 15

<210> 50

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 50

gacagattcc acgcg 15

<210> 51

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 51

gacaggtttc acgct 15

<210> 52

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 52

gacaggtttc atgcc 15

<210> 53

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 53

gaccgattcc acgcg 15

<210> 54

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 54

gaccgattcc acgct 15

<210> 55

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 55

gaccgattcc atgcc 15

<210> 56

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 56

gaccgattcc atgcg 15

<210> 57

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 57

gaccgattcc atgct 15

<210> 58

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 58

gaccgatttc atgcc 15

<210> 59

<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 59
gaccgcttcc acgcc 15

<210> 60
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 60
gaccgcttcc acgcg 15

<210> 61
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 61
gaccgcttcc acgct 15

<210> 62
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 62

gaccgctttc acgca 15

<210> 63

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 63

gaccggttcc acgca 15

<210> 64

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 64

gaccggttcc atgcc 15

<210> 65

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 65
gaccggtttc acgca 15

<210> 66
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 66
gatagattcc acgct 15

<210> 67
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence.

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 67
gatagatttc acgcc 15

<210> 68
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 68
gatagatttc acgcg 15

<210> 69
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 69
gatagatttc acgct 15

<210> 70
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 70
gataggttcc acgct 15

<210> 71
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 71
gatcgatttc acgca 15

<210> 72
<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 72

gatcgcttcc acgca 15

<210> 73

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 73

gatcgctttc acgct 15

<210> 74

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 74

gatcggttcc acgca 15

<210> 75

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 75

ctagcgaatt cgagcatatg agcactagtg catgcgagcc atattcaacg ggaaacgtct 60
tgc 63

<210> 76

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 76

tcgagcaaga cgtttcccg tgaatatggc tcgcatgcac tagtgctcat atgctcgaat 60
tcg 63

<210> 77

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 77

tatgagggtg cgcgggctg catg 24

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 78

cagccggcgg taccctca 18

<210> 79

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 79

tatgagggtta ccgccggcac tgcattg 26

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400>80

cactgccggc ggtaccctca 20

<210> 81

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 81

ctcatatggc tggatcacc ggtgcctgtg 30

<210> 82

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 82

gcggatccct aaaaattgat gtcttcaag 30

<210>83

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 83

tatggcgtg attaccgtg cgtgcgaacg tgatgtcag tgcggtgcgg gtacctgctg 60
cgcgattagc ctgtggctgc gtggtctg 88

<210> 84

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 84

cgtatgtgca ccccgctggg tcgtgaaggt gaagaatgcc atccgggtag ccataaagtg 60

ccgttcttcc gttaaactgaa acatcatacc tg

92

<210> 85

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 85

cccgtgcctg ccgaacctgc tgtgcagccg tttcccgat ggicgttate gttgcagcat 60
ggatctgaaa aacattaact ttagg 86

<210> 86

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 86

cacatacgca gaccacgcag ccacaggcta atcgcgacgc aggtaccgc accgcactgc 60
acatcacgtt cgcacgcacc ggtaatcacc gcc 94

<210> 87

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 87

aggcacgggc aggtatgatg ttacgttta cggaagaacg gcactttatg gctaccgga 60

tggcattctt caccttcacg acccagcggg gtg 93

<210> 88

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 88

gatccctaaa agttaatgtt tttcagatcc atgctgcaac gataacgacc atccgggaaa 60

cggctgcaca gcaggttcgg c 81

<210> 89

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 89

agagtttgcc ggcaccggtc cggtagccgc accgcactgc acrtcncgyt crcangcncc 60

ngtdatnacn gccatatgtt ggcgc 85

<210> 90

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 90

agagtttgcc ggcaccggtc cggtagccgc accgcactgc acrtcyctyt crcangcncc 60

ngtdatnacn gccatatgtt ggcgc

85

<210> 91

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 91

gcgccaacat atg 13

<210>92

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 92

acctgattgc ccgacattat cgc 23

<210> 93

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 93

cacccatc agtgccaaca tag 23

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 94

taatacgact cactataggg 20

<210>95

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 95

atacatggat cctcaggtca tccttggaga gc 32

<210>96

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 96

tatggctcca gcgcatcgtg ggcgtgggtg ttggacttta aatagtgctg galacttggt 60
aggtccagtg ttacatttaa gcagcaaagc aaaccagggc 100

<210>97

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 97

aggaagacag actcagctct tgagatccta gatctgtgga aggccatag atgggcttcct 60
tattctcggc ctccccgcat gacgtgag 88

<210> 98

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 98

ttgctttgct gcttaaagt aacactggac ctaacaagta tccagcacta tttaaagtcc 60
aaccaccacg cccacgatgc gctgggtgcca 90

<210> 99

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 99

gatcctcagc tcatgcgggg agaccgagaa taaggaagcc catctatggc ctccacaga 60
tctaggatct caagagctga gtctgtcttc ctgcccctgt 100

<210>100

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 100

ggaattcgct cgcaccggta gaaaaaatgg 30

<210>101

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 101

ctagccattt tttctaccgg tgcgagcgaa ttccgc 36

<210>102

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 102

aattccgtcg tacaccaatgg gccccacct cggcccctac cgtgtggggc tgctc 55

<210>103

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 103

ccgggagcag cccacacgg tagggcgga ggtggaggcc catggtgtac gacgg 55

<210>104

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 104

aattccgtcg tacaccatgg gcctgcacct gcggccctac cgggtgggcc tgctg 55

<210>105

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 105

ccggcagcag gccacccgg tagggccgca ggtgcaggcc catggtgtac gacgg 55

<210>106

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 106

aattccgtcg tacaccatgg gatttcacct tagaccctac agagtgggac ttctt 55

<210>107

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 107

ccggaagaag tcccactctg taaggcttaa ggtgaagtcc catggtgtac gacgg 55

<210>108

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 108

aattccgtcg tacaccatgg gctacatct acgtccgtat cgtgtaggtc tacta 55

<210>109

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 109

ccggtagtag acctacacga tacggacgta gatgtagacc catggtgtac gacgg 55

<210>110

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 110

aattccgtcg tacacatgg ggctacatct acgcccgtat cgcgtagggc tacta 55

<210>111

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 111

ccggtagtag ccctacgga tacgggcgta gatgtagccc catggtgtac gacgg 55

<210>112

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 112

aattccgtcg tacacatgg gtctacatct tagaccctat cgtgtaggac tgctt 55

<210>113

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 113

ccggaagcag tcctacacga tagggtctaa gatgtagacc catggtgtac gacgg 55

<210>114

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 114

aattccgtcg tacaccatgg gtctacatct tagaccctac cgagttggat tgcct 55

<210>115

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 115

ccggaagcaa tccaactcgg tagggtctaa gatgtagacc catggtgtac gacgg 55

<210> 116

<211> 23

<212> PRT

<213> Human

<400> 116

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15
 Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
 20 23

<210> 117
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 117

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
 5 10 15
 Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
 20 25 30
 Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val
 35 40 45
 Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
 50 55 60
 Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
 65 70 75 80
 Leu Lys Asn Ile Asn Phe
 85

<210> 118
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 118

Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His
 1 5 10 15
 Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu
 20 25 30
 Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp
 35 40 45

Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
 50 55 60
 Ile Lys Gly Val Ser Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Leu Ala Ser Lys Ser Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu
 85 90 95
 Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
 100 105 110
 Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
 115 120 125
 Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
 130 135 140
 Lys Ser
 145 146

<210> 119

<211> 180

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 119

gctccagcgc atcgtgggcg tggtggttgg actttaaata gtgctgggta cctcctgggt 60
 cctgtcctcc acctttcttc aaaggccaac cagggcagga agacagactc agctcttgag 120
 atcctagacc tgtggaaggc catagatggg ctcccttatt cccgctctcc aaggatgacc 180

<210> 120

<211> 228

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 120

gatcgatttc acgcaactag tgctgactgc tgcatttcct acaccccacg aagcatcccg 60
tggtcactcc tggagagtta ctttgaaacg aacagcgagt gctccaagcc ggggtgcatc 120
ttcttcacca agaaggggcg acgtttctgt gccaacccca gtgataagca agttcagggt 180
tgcattgagaa tgctgaagct ggacacacgg atcaagacca ggaagaat 228

<210> 121

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 121

gcggtgatta ccggtgcgig cgaacgtgat gtgcagtgcg gtgcgggtac ctgctgcgcg 60
attagcctgt ggctgcgtgg tctgcgtatg tgcaccccg tgggtcgtga aggtgaagaa 120
tgccatccgg gtagccataa agtgccgttc ttccgtaaac gtaaacaatca tacctgcccg 180
tgccatccga acctgctgtg cagccgttcc ccggatggtc gttatcgttg cagcatggat 240
ctgaaaaaca ttaacttt 258

<210> 122

<211> 180

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 122

gtccagcgc atcgtgggcg tgggtggttg acttttaaata gtgctggata cttgttaggt 60
ccagtgttac atttaagcag caaagcaaac cagggcagga agacagactc agctcttgag 120
atcctagatc tgtggaaggc catagatggg cticcttatt ctcggtctcc ccgcatgacg 180

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N 15/10, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 15/10, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 97/11086 A1 (General Hospital Corporation), 27 March, 1997 (27.03.97), & EP 851868 A & US 5795737 A & JP 11-511334 A	7-8,10-12 1-6,9
X A	WO 96/09378 A1 (General Hospital Corporation), 28 March, 1996 (28.03.96), & EP 781329 A & US 5786464 A & JP 10-506278 A & AU 9535099 A & ZA 9507846 A	7-8,10-12 1-6,9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 October, 2001 (24.10.01)Date of mailing of the international search report
06 November, 2001 (06.11.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/10, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/10, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 97/11086 A1 (GEN. HOSPITAL CORP.) 27. 3月. 1997 (27. 03. 97) & EP 851868 A & US 5795737 A & JP 11-511334 A	7-8, 10-12 1-6, 9
X A	WO 96/09378 A1 (GEN. HOSPITAL CORP.) 28. 3月. 1996 (28. 03. 96) & EP 781329 A & US 5786464 A & JP 10-506278 A & AU 9535099 A & ZA 9507846 A	7-8, 10-12 1-6, 9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 10. 01

国際調査報告の発送日

06.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448